

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
FACULTE DE PHARMACIE

Année 1978 - N° 151

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - Faculté de Pharmacie

et soutenue publiquement le 28 Juin 1978

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ETAT ES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

par

Charles DELLAMONICA

né le 12 Janvier 1949

à LYON 6°

**ETUDE DE LA REACTION COUPLEE
CREATINE-KINASE/LUCIFERINE-LUCIFERASE.
APPLICATION AU DEPISTAGE SYSTEMATIQUE
NEONATAL DE LA MYOPATHIE
DE DUCHENNE DE BOULOGNE.**

JURY : Monsieur le Professeur J. COTTE
Monsieur le Professeur M. CARRAZ
Monsieur le Professeur J.-M. ROBERT
Monsieur le Professeur P. GUIBAUD
Monsieur le Professeur C. COLLOMBEL
Monsieur P. BALTASSAT

29

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1976 - 1977

THÈSE

présentée

à l'Université Claude Bernard - Faculté de Pharmacie

et soutenue publiquement le 29 juin 1977

DOCTEUR D'ÉTAT EN SCIENCES PHARMACIQUES

Digitized by the Internet Archive
in 2026

ETUDE DE LA REACTION COUPLÉE
CREATINE-KINASE-LUCIFERINE-LUCIFÉRASE
APPLICATION AU DOSAGE SYSTÉMATIQUE
NÉONATAL DE LA MYOPATHIE
DE DUCHENNE DE BOULOGNE

Président : Monsieur le Professeur J. COYNE

Membres : Monsieur le Professeur M. CARSAZ

Membres : Monsieur J.-M. ROBERT

Membres : Monsieur Z. GUISARD

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
FACULTE DE PHARMACIE

Année 1978 - N°

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - Faculté de Pharmacie

et soutenue publiquement le 28 Juin 1978

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ETAT ES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

par

Charles DELLAMONICA

né le 12 Janvier 1949

à LYON 6°

**ETUDE DE LA REACTION COUPLEE
CREATINE-KINASE/LUCIFERINE-LUCIFERASE.
APPLICATION AU DEPISTAGE SYSTEMATIQUE
NEONATAL DE LA MYOPATHIE
DE DUCHENNE DE BOULOGNE.**

JURY : Monsieur le Professeur J. COTTE
Monsieur le Professeur M. CARRAZ
Monsieur le Professeur J.-M. ROBERT
Monsieur le Professeur P. GUIBAUD
Monsieur le Professeur C. COLLOMBEL
Monsieur P. BALTASSAT

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1972 - 73

THÈSE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - Faculté de Pharmacie

et soutenue publiquement le 26 Juin 1973

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ÉTAT EN SCIENCES PHARMACIQUES

par

Charles DELAMONICA

né le 12 février 1949

à LYON 6^e



ETUDE DE LA RÉACTION COUPÉE
CREATIVE-KIMZELUCIFÈRE-LUCIFÈRE
APPLICATION AU DÉPISTAGE SYSTÉMATIQUE
NÉONATAL DE LA MYOPATHIE
DE BUCHÈRE DE SOULONNE

Je soussigné, Docteur en Pharmacie, certifie que
Monsieur Charles DELAMONICA a été
admis à l'inscription à la Faculté de Pharmacie
de l'Université Claude-Bernard - Lyon I
le 12 février 1973.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD.

* **

Président : Monsieur le Professeur D. GERMAIN

Premier Vice-Président : Monsieur le Professeur ELBAZ

Deuxième Vice-Président : Monsieur P. PONCET, Maître-Assistant.

Troisième Vice-Président : Monsieur C. BADOR, Etudiant.

Secrétaire Général de l'Université : Monsieur J. RAMBAUD, Administrateur Civil.

DIRECTEURS DES U.E.R. ET DOYENS DES FACULTES :

FACULTE de MEDECINE GRANGE-BLANCHE : *Monsieur Bernard SALLE, M.C.A.*

FACULTE de MEDECINE ALEXIS-CARREL : *Monsieur le Professeur René MORNEX*

U.E.R. de MEDECINE LYON-NORD : *Monsieur Jean-Pierre NEIDHARDT, M.C.A.*

FACULTE de MEDECINE SUD-OUEST : *Monsieur le Professeur Jean NORMAND*

FACULTE de PHARMACIE : *Monsieur le Professeur Charles-Albert BIZOLLON*

U.E.R. de TECHNIQUES DE READAPTATION : *Monsieur Alain MORGON, M.C.A.*

U.E.R. de BIOLOGIE HUMAINE : *Monsieur Jean-Pierre REVILLARD, M.C.A.*

U.E.R. I.R.E.P.S. : *Monsieur Albert MILLON, Professeur d'E.P.S.*

U.E.R. de SCIENCES ODONTOLOGIQUES : *Monsieur le Docteur Roger VINCENT*

U.E.R. de MATHEMATIQUES : *Monsieur le Professeur Edmond COMBET*

U.E.R. de PHYSIQUE : *Monsieur le Professeur Jean DELMAU*

U.E.R. de CHIMIE-BIOLOGIE : *Monsieur le Professeur Jean HUET*

U.E.R. de SCIENCES DE LA NATURE : *Monsieur le Professeur René GINET*

U.E.R. de SCIENCES PHYSIOLOGIQUES : *Mademoiselle le Professeur Jeanne-Françoise WORBE*

U.E.R. de PHYSIQUE-NUCLEAIRE : *Monsieur le Professeur Mark GUSAKOW*

I.U.T. n° 1 : *Monsieur le Professeur Bernard POUYET*

I.U.T. n° 2 : *Monsieur J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.*

OBSERVATOIRE DE LYON : *Monsieur Guy MONNET, Astronome Adjoint.*

U.E.R. de MECANIQUE : *Mademoiselle le Professeur Geneviève COMTE-BELLOT.*

A ma femme,

A nos enfants Jérôme, Laure et Arnaud,

A mes parents en témoignage de reconnaissance et d'affection.

A mon frère — que tous mes vœux de réussite l'accompagne dans sa carrière.

A Manouche,

A Poupette,

A ma famille et ma belle-famille

A tous mes amis et compagnons de montagne.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur J. COTTE,

Biologiste, Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Debrousse.

Au cours de notre externat et internat, il a su nous communiquer son enthousiasme et son esprit d'entreprise. Nous sommes très honoré d'appartenir à l'équipe qu'il conduit et qu'il anime à l'Hôpital Debrousse et dont la qualité et la notoriété des travaux témoignent du dynamisme et de l'efficacité de son "Manager".

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur C. COLLOMBEL,

Biologiste, Laboratoire de Biochimie, Hôpital des Charpennes.

Il a su nous communiquer "le feu sacré" et nous donner une image de dévouement et de labeur pour le développement de la biochimie pédiatrique. Nous sommes très honoré d'avoir été choisi pour mettre en place et conduire le dépistage systématique néonatal de la myopathie de Duchenne de Boulogne.

Monsieur P. BALTASSAT,

Biologiste adjoint, Laboratoire de Biochimie, Hôpital Debrousse.

*Sous la plume de cet "Humaniste" en Biologie,
Science et littérature se réconcilient.
Qu'il trouve ici, en témoignage d'amitié,
Une marque de gratitude pour le remercier,
De son travail, de sa disponibilité,
Et des conseils dont nous avons bénéficiés.*

Monsieur le Professeur J.M. ROBERT,

Chef de Service de Génétique, Hôtel Dieu.

C'est sous son impulsion que nous avons entrepris et conduit ce travail, au cours duquel il n'a cessé de nous témoigner sa confiance qui est la base indispensable de la collaboration étroite avec son service de génétique. Nous tenons ici à le remercier de ses encouragements et nous sommes reconnaissants de l'accueil de ses collaborateurs.

Monsieur le Professeur Agrégé P. GUIBAUD,
Hôpital Debrousse.

Nous avons apprécié la netteté et la rigueur de son jugement, nous espérons continuer ce travail et développer le diagnostic prénatal de la myopathie en installant, grâce à ses conseils, une collaboration encore plus enrichissante et bénéfique.

Monsieur le Professeur M. CARRAZ,
Directeur de l'Institut Pasteur de Lyon.

Qu'il trouve ici un témoignage de respect et d'admiration pour l'oeuvre qu'il poursuit à Lyon. Nous lui sommes très reconnaissant de bien vouloir siéger parmi nos juges.

Monsieur le Professeur G. SIEST
Secrétaire Général de la Société Française de Biologie Clinique.

Nous lui adressons l'expression de notre plus vive admiration pour le travail qu'il accomplit au sein de la Société Française de Biologie Clinique. Nous le remercions de l'honneur qu'il nous fait en acceptant de juger notre travail.

Nous avons apprécié la grande autorité Scientifique de Mademoiselle MATHIEU dans le domaine de l'enzymologie. Sa compétence dans le diagnostic prénatal nous sera d'un grand secours.

Qu'elle veuille accepter le témoignage de notre respectueuse et très admirative amitié.

Nous espérons continuer à développer le dépistage systématique néonatal de la myopathie de Duchenne de Boulogne en collaboration avec Mademoiselle DORCHE qui assume la responsabilité scientifique du laboratoire de dépistage avec discrétion et une compétence sans faille.

Que Claude trouve ici le témoignage de notre profonde estime et notre reconnaissance.

Nous avons été très sensible à l'amical intérêt que les adjoints, les assistants, et les attachés du laboratoire de biochimie ont apporté à ce travail.

Nous remercions Martine ANNAT et Yves BOUTIERE de l'aide technique qu'ils nous ont apportée avec tant d'efficacité et de compétence.

Nous remercions également Marie-Odile ROLLAND dont les conseils fructueux nous furent des plus précieux.

Nous remercions vivement l'Association Française contre la myopathie de son aide matériel et de l'intérêt qu'elle a manifesté pour ce travail. Nous espérons ce dernier digne de sa confiance par la contribution qu'il apporte à la lutte contre la myopathie.

Que sa présidente, Madame DE KEPPER, veuille bien trouver ici le témoignage de notre admiration pour la cause qu'elle défend. Nous nous efforcerons d'y contribuer de notre mieux.

J'adresse au Docteur G. SCHEUERBRANDT l'expression de mes plus vifs remerciements pour les nombreux documents qu'il nous a transmis ainsi que pour les conseils, l'aide matérielle et scientifique qu'il nous a apportés.

SIGNIFICATION DES ABREVIATIONS EMPLOYEES.

ADP	:	Adénosine Diphosphate.
AK	:	Adénylate Kinase (E.C.2.7.4.3)
AMP	:	Adénosine Monophosphate.
A.R.D.E.M.M.E.	:	Association Régionale pour le Dépistage et l'Etude des Maladies Métaboliques de l'Enfant (Association régie par la loi 1901 : siège social - HOTEL DIEU. 1 place de l'Hôpital 69002 LYON).
ATP	:	Adénosine Triphosphate
ATP-LL ou ATP/LL	:	Réaction de bioluminescence du système ATP-Luciférine-Luciférase.
CK	:	Créatine Kinase (E.C.2.7.3.2)
CK - ATP - LL	:	Réaction couplée de la créatine kinase et de la luciférine-luciférase.
CK - Screening-Test	:	Test de dépistage systématique néonatal de la Myopathie de Duchenne de Boulogne.
CP	:	Créatine Phosphate.
CoA	:	Coenzyme A
CTP	:	Cytosine Triphosphate
DASS	:	Direction Départementale de l'Action Sanitaire et Sociale.
DMD	:	Dystrophie Musculaire de Duchenne de Boulogne.
	:	Duchenne Muscular Dystrophy
	:	Dystrophic Muscular Disease
DTNB	:	5-5'-dithio-bis-2 nitro benzoïque acide
DTT	:	Dithiotreitol
E	:	Enzyme "Luciférase" (E.C.2.7. non défini)
E-LH ₂ -AMP	:	Complexe "Luciférase-Luciférine-AMP)
EMG	:	Electromyographie
F	:	Fille
G	:	Garçon
G6PD	:	Glucose-6-Phosphate deshydrogenase (E.C.1.1.1.49)
h ν	:	Photon (h : constante de Planck, ν : fréquence du rayonnement)
GTP	:	Guanosine Triphosphate.
ITP	:	Inosine triphosphate
Kcal	:	Kilocalorie
Km	:	Constante de Michaelis Menten
Ki	:	Constante d'inhibition.
L	:	dehydroluciférine.

LDH	:	Lactate dehydrogenase (E.C.1.1.1.27)
LH2	:	Luciférine
LH2-AMP	:	Adénylate de luciférine ou luciféryl-Adénylate.
MOPS	:	Morpholinopropane sulfonique acide
NC	:	Tests positifs non contrôlés
OxyL*	:	Oxyluciférine à l'état excité
oxyL	:	Oxyluciférine à l'état fondamental
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
PEP	:	Phospho-enol-pyruvate (E.C.4.1.1.49)
PPi	:	Pyrophosphate inorganique
SFBC	:	Société Française de Biologie Clinique
UI	:	Unité Internationale
UL	:	Unité Lumière (unité arbitraire)
UTP	:	Uridine Triphosphate
XDP	:	Nucléoside Diphosphate divers.

INTRODUCTION.

Le nom générique de dystrophies musculaires progressives regroupe un ensemble de myopathies primitives, dégénératives, d'évolution lente et progressive et de caractère le plus souvent héréditaire.

Le terme "Myopathie" a été appliqué pour la première fois par ERB en 1882 à un ensemble de faits cliniques jusque là disparates.

Dès 1868, DUCHENNE de BOULOGNE (64) donne la description de la maladie qui portera son nom, et en 1891, il confirme avec CHARCOT, par un examen anatomo-pathologique post-mortem l'intégrité du système nerveux et souligne la "primitivité" de l'atteinte musculaire.

Dans la classification des myopathies héréditaires proposée par WALTON et GARDNER-MEDWIN (211), la maladie de DUCHENNE de BOULOGNE s'individualise comme la forme sévère, liée au chromosome X des dystrophies musculaires "véritables".

L'étude des enzymes sériques dans la myopathie a débuté en 1953 avec les travaux de SCHAPIRA, DREYFUS et SCHAPIRA (178) qui mirent en évidence une très forte augmentation de l'activité sérique de la fructose 1,6 aldolase. (EC. 4. 1. 2. 13) à la suite de l'observation de SIBLEY et LENNINGER (185).

Par la suite, d'autres auteurs décrivent l'élévation de nombreuses enzymes (189). Mais celle dont l'augmentation est la plus importante et la plus spécifique, est la créatine-kinase (CK) (EC. 2. 7. 3. 2.) comme l'a montré EBASHI et al. (65) en 1959, DREYFUS et al. (57), SHAW et al. (184), COTTE et al. (36).

En 1960, DREYFUS et al. (55) et en 1961 PEARSON et al. (153, 154), ont mis en évidence la précocité de l'élévation des enzymes sériques qui précède l'apparition des signes cliniques.

HEYCK, LAUDAHN et CARSTEN (84) rapportent en 1966 une très forte élévation de la CK chez un enfant âgé de 9 jours, issu d'une famille à risque pour la myopathie.

En 1971 DEMOS (45, 46) confirme l'importance de la détermination de l'activité de la CK pour le diagnostic précoce de la myopathie de DUCHENNE de BOULOGNE (DMD).

A la suite des travaux de BODENSTEINER et de ZELLWEGER (19, 20) ZELLWEGER et ANTONIK (218) proposent en 1974 un test de screening de la myopathie réalisé sur une goutte de sang prélevée à la période néo-natale sur un support de papier.

En fait l'idée d'un test de dépistage revient à KELLY et al. (97) qui propose en 1968 une évaluation de l'activité sérique de la CK selon un principe semblable à celui que BEUTLER (13) avait proposé pour le screening du déficit de la G6PD. Par ailleurs, et indépendamment des résultats de KELLY, PATERSON (150) proposa en 1971 l'application d'un test identique au dépistage néo-natal de la DMD. Cependant, ces deux protocoles identiques utilisent le sérum, nécessitant une centrifugation préalable. Ils ne sont pas applicables à un programme de dépistage systématique de masse.

L'originalité de la technique de ZELLWEGER et ANTONIK est de présenter une approche nouvelle, de la lutte à terme contre cette maladie, par un dépistage néonatal de masse.

“La technique mise au point par Alan ANTONIK pour rechercher et doser la CK dans un échantillon sec et stable de sang imprégné sur un support” décrite en 1974 (Brevet US N° 493 874 du 2 Août 1974) fait appel à une réaction originale (2) :

En effet, la Créatine-Kinase apportée par l'échantillon produit en présence d'Adenosine Diphosphate (ADP) et de Créatine Phosphate (CP) de l'Adenosine Triphosphate (ATP) que l'on met en évidence par une réaction de bioluminescence à l'aide du système enzymatique : Luciferine-Luciférase (LL). Au cours d'une étape préalable, l'ATP préexistant dans l'échantillon a été détruit par le même système enzymatique. Ainsi, après addition de CP, plus la bioluminescence est intense, plus l'activité de la CK est importante.

JUSTIFICATION DU DEPISTAGE DE LA MYOPATHIE DE DUCHENNE DE BOULOGNE

1. CARACTERES DE LA MALADIE (141-220).

1-1. Clinique (208).

Le tableau clinique est dominé par une diminution de la force musculaire et des modifications de la consistance du muscle.

Les signes sont en général symétriques par rapport à l'axe du corps. Ils apparaissent chez le garçon à partir de deux ans, mais 80 % des diagnostics sont portés entre 3 et 7 ans (7).

– *Diminution de la force musculaire* (108)

Elle est progressive et s'observe essentiellement au niveau des racines des membres et du tronc, contrastant avec une conservation de la force des extrémités. Elle se manifeste :

- . lors de la marche qui est dandinante “en canard” (l'atteinte du quadriceps étant “compensée” par des mouvements de bascule du bassin), lente et maladroit. Les chutes sont fréquentes et lorsque l'enfant est assis sur le sol, sa façon de se relever est caractéristique. (signe de GOWERS). Les escaliers sont “escaladés” difficilement.

- . au niveau du tronc s'observent des modifications plus ou moins importantes de la statique vertébrale : cyphose dorsale haute, hyperlordose lombaire, scoliose et modification de l'aspect du thorax.

- . à la racine des membres supérieurs, le déficit domine sur les muscles postérieurs de l'épaule, entraînant décollement et saillie du bord postérieur de l'omoplate.

– *Modifications du volume des muscles.*

Elles sont constantes, traduisant soit une atrophie, soit une hypertrophie (80 % des cas). Cette pseudo-hypertrophie est limitée à quelques muscles symétriques et le plus souvent aux mollets. La consistance musculaire est variable et irrégulière. Les rétractions fibro-tendineuses sont secondaires à la sclérose et aux attitudes vicieuses.

– *Evolution de la maladie de DUCHENNE de BOULOGNE (209).*

Le déficit moteur et l'atrophie musculaire remontent vers la ceinture scapulaire, entraînant rétractions tendineuses, déformations des membres et du thorax (cypho-scoliose) réduction de la capacité respiratoire. Le sujet est grabataire, insuffisant respiratoire chronique. Guetté par les complications infectieuses du décubitus, il meurt en général avant 20 ans, lors d'une insuffisance respiratoire aigüe ou au cours d'une défaillance cardiaque.

– *Autres myopathies liées au chromosome X (182).*

Nettement moins importantes (environ 10 % des cas), ces formes présentent un aspect clinique voisin de la maladie de DUCHENNE, mais en diffèrent par l'âge du début de l'évolution.

. la forme décrite par BECKER (6) se caractérise par un début plus tardif, entre 5 et 25 ans, une évolution très lente, permettant la marche jusqu'à l'âge de 30 ans et une survie dépassant la quatrième décennie. Dans ces cas, l'élévation des enzymes sériques est en moyenne moins importante que dans la forme grave.

. Selon l'existence ou l'absence d'une atteinte cardiaque ou de rétractions tendineuses, plusieurs autres formes ont été individualisées.

. Enfin, il existe des formes à début ultra-tardif (début des signes après 50 ans - cas rapporté par ROBERT).

1-2. Biochimie (45, 46, 176).

Les premiers stigmates biochimiques connus furent l'élévation de l'excrétion de la créatine dans les urines et la chute de l'excrétion de la créatinine.

On estime que toute excrétion de créatine urinaire qui dépasse notablement le dixième de la valeur de la créatinine excrétée, traduit un désordre métabolique important, méritant d'être retenu (41). La créatine étant en grande partie synthétisée par le muscle, on a longtemps pensé tenir là, un fait fondamental et spécifique de dystrophie. Cependant, des processus pathologiques autres (hépatiques, pancréatiques, rénaux), peuvent aussi perturber l'excrétion de la créatine. L'intérêt diagnostique du dosage de la créatine urinaire a été largement dépassé par l'enzymologie sérique (146).

Comme nous l'avons précédemment mentionné, de nombreuses enzymes ont été étudiées comme l'aspartate amino-transférase (EC. 2. 6. 1. 1.) l'alanine amino-transférase (EC. 2. 6. 1. 2.), la lactate déhydrogénase (EC. 1. 1. 1. 27.), la fructose 1,6-diphosphatase (EC. 3. 1. 3. 11.), mais tous les auteurs reconnaissent la créatine kinase ou créatine phospho-kinase (EC. 2. 7. 3. 2.) comme la plus significative, la plus spécifique et la plus fiable. (177, 206, 207).

L'augmentation du taux de CK est extrêmement précoce : DEMOS (42, 45, 46, 48) rapporte que 8 cas de myopathies par la suite confirmés, avaient un taux de créatine kinase sérique moyen de $2131 \text{ UI} \times \text{l}^{-1}$ à la naissance (valeurs extrêmes : 583 à 4482 UI - Valeurs normales : 50 UI).

1-3. Anatomo-Pathologie (29, 59).

L'étude histologique des biopsies musculaires révèle une anomalie des fibres musculaires (10 à 100 microns), la répartition des fibres atrophiées, semblant totalement anarchique. Le tissu

conjonctif est augmenté avec accumulation de graisse dans le conjonctif. Au sein de la fibre, on note une hyperchromie de certains noyaux qui augmentent de volume et de nombre et perdent leur localisation périphérique et migrent vers le centre de la fibre.

On note également une dégénérescence fibrillaire avec nécrose, phagocytose et régénération.

La microscopie électronique a permis de préciser que l'anomalie la plus précoce est une vacuolisation du réticulum sarcoplasmique suivie d'un élargissement des espaces inter-fibrillaires et de lobularisation des mitochondries. De plus, chez les mères malades, les mitochondries présentent toutes des anomalies et des interruptions myofibrillaires ont été observées.

1-4. Electromyographie (4, 157).

L'électromyogramme montre, lors de la contraction musculaire volontaire, un tracé caractérisé par la recherche des unités mises en jeu contrastant avec la faiblesse des potentiels recueillis ; les potentiels sont de durées et d'amplitudes faibles lors de la contraction maximum et on peut observer parfois des ondes polyphasiques.

1-5. Génétique (18, 80, 163).

La DMD est transmise sur le mode gonosomique recessif liée au chromosome X. Le mode de transmission explique l'autonomie de la maladie de DUCHENNE et de ses variants cliniques.

On n'observe jamais au sein d'une même famille l'association de plusieurs formes cliniques de la dystrophie liée au sexe.

Le mode de transmission lié au chromosome X repose sur de nombreux arguments, mais n'a jamais reçu de preuves absolues. L'étude de nombreuses généalogies permet de retrouver la tare transmise sur plusieurs générations chez les fils, les frères et les oncles de la mère. (155).

Des garçons atteints de la maladie de DUCHENNE peuvent avoir la même mère, mais des pères différents. Enfin des cas typiques ont été observés chez les femmes XO ou XX/XO. (92).

De plus la sensibilité nouvelle des techniques d'évaluation des activités enzymatiques a permis la détection des conductrices dans 80 % des cas. (56, 85, 142).

L'ensemble de ces constatations a conduit à évoquer pour ces transmettrices l'hypothèse de la Mosaïque du chromosome X de MARY LYON (113) qui a été présentée en détail par PEARSON (153) en 1963 : étant donné la nature multinuclée des cellules musculaires avec des noyaux provenant de la fusion de plusieurs cellules, il s'agirait d'un mosaïcisme atténué. Le chromosome X malade, transmis par la mère à la fille étant dans 50 % des cellules, le chromosome X "dormant", le deuxième chromosome X transmis par le père étant dans les 50 % des cellules restantes, le chromosome "dormant".

On expliquerait ainsi certains cas de myopathie chez la fille pour lesquelles, les chromosomes X défectueux maternels sont présents dans les cellules précurseurs des fibres : deux fois sur trois, la biopsie a révélé des lésions focales.

L'incidence de la maladie est très variable selon les auteurs.

La lecture du tableau (1) donne une idée de la dispersion des chiffres avancés.

Nos résultats personnels (cf. IV) conduisent au chiffre de 1 naissance d'un garçon myopathique pour 5000 naissances mâles.

En conclusion, la myopathie de DUCHENNE de BOULOGNE présente les caractères suivants :

- apparition tardive des signes cliniques entraînant un diagnostic clinique tardif,
- existence très précoce d'une élévation presque spécifique (50 à 200 fois la valeur la plus fréquente) de l'activité sérique de la créatine kinase,
- Maladie héréditaire à transmission récessive liée au chromosome X,
- Moyens très fiables de confirmer ou d'infirmer le diagnostic suspecté (examen anatomopathologique, biochimie)
- Possibilités thérapeutiques décevantes, uniquement palliatives,
- Incidence de 1/5000 naissances mâles environ - ce qui place la DMD parmi les maladies héréditaires les plus fréquentes et les plus redoutables.

Ces caractères conduisent donc à l'interrogation suivante :

“Le dépistage systématique à la naissance d'une maladie telle que la myopathie de Duchenne, pour laquelle il n'existe pas de traitement est-il justifié sur le plan éthique, médical, social et économique ?”.

TABLEAU N° 1

INCIDENCES DE LA MYOPATHIE DE DUCHENNE - Revue de la littérature.

ETUDES rapportées par : BROOKS et EMERY (25)	Période	Nb. de cas	Nombre de naissances mâles Pdt la période citée.	INCIDENCE
STEPHENS - TYLER USA 1951 (192)	1931-40	18	63.000	$28,6 \pm 6,7 \times 10^{-5}$
STEVENSON (1953, 1958) Ireland du nord	1942-51	28	159.692	$18,2 \pm 3,4 \times 10^{-5}$
WALTON (1955) Angleterre NE (210)	1940-46	18	138.403	$13,0 \pm 3,1 \times 10^{-5}$
BLYTH et PUGH (1959) Leeds (17)	1939-49	7	46.210	$15,1 \pm 5,7 \times 10^{-5}$
MOSER et al. (1964) Suisse (141)	1939-54	26	119.395	$21,8 \pm 3,2 \times 10^{-5}$
KUROIWA et MIYAZAKI (1967) Japon.	1949-58	9	46.465	$19,4 \pm 6,4 \times 10^{-5}$
GARDNER-MEDWIN (1970) M.E. Angleterre (71).	1952-60	77	236.200	$32,6 \pm 3,7 \times 10^{-5}$
PROT (1971) Varsovie Pologne.	1953-60	46	328.110	$14,0 \pm 2,1 \times 10^{-5}$
LAWRENCE et al. (1973) Australie (106).	1957-63	49	223.330	$21,9 \pm 3,1 \times 10^{-5}$
BROOKS et al. (1977) Ecosse (25).	1953-68	47	177.413	$26,5 \pm 3,2 \times 10^{-5}$
TOTAL		325	1532.218	$21,2 \pm 1,2 \times 10^{-5}$
AUTRES ETUDES	Période	Nb. de cas	Nombre de naissances mâles	INCIDENCE
MORTON et CHUNG (1959) Wisconsin (140).				27×10^{-5}
HURSE et KAKULAS (1974) Australie (87)	1960-64 1965-69	21 7	100.000 100.000	21×10^{-5} 7×10^{-5}
ZELLWEGER (1974) Iowa (219)	?	180	600.000	30×10^{-5}
TAKESHITA (1977) Shimame Japon (203)	1956-60 1961-65 1966-70	7 4 8	26.992 29.593 34.572	$25,9 \times 10^{-5}$ $13,5 \times 10^{-5}$ $23,1 \times 10^{-5}$

2. JUSTIFICATION DU DEPISTAGE NEONATAL DE LA DMD.

Le Comité "Foetus and new born" de l'Académie Américaine de Pédiatrie, a défini les caractéristiques des maladies qui peuvent être l'objet d'un dépistage néonatal systématique (35).

JANEWAY (93) a récemment publié ces caractéristiques qui avaient été par ailleurs proposées par l'OMS (148).

1 – "Le test de screening doit être simple, bon marché et facile à réaliser sur des petits échantillons facilement prélevés. Ces échantillons doivent être stables pendant la durée du transport au laboratoire".

2 – "Le screening doit être suffisamment sensible pour identifier tous les cas. Il peut y avoir un certain nombre de cas faux-positifs, mais aucun cas faux-négatif".

3 – "Il doit exister des moyens rapides et faciles à mettre en oeuvre par une équipe expérimentée, faisant appel à des techniques fiables afin d'identifier rapidement les cas positifs".

4 – "Il doit exister un traitement efficace de la maladie, dont le malade pourra bénéficier une fois que le trouble aura été identifié".

5 – "La morbidité de la maladie doit justifier le screening".

Par souci de clarté, les caractéristiques mentionnées dans le premier point seront développées dans le chapitre I. Le problème de la sensibilité du test sera abordé au cours de la discussion.

Nous envisagerons ci-dessous successivement chacun des autres points en montrant que les données de la littérature nous permettaient de mettre en place le programme de dépistage.

"Il doit exister des moyens rapides et faciles à mettre en oeuvre, faisant appel à des techniques fiables afin d'identifier rapidement les cas positifs".

L'étude des activités enzymatiques sériques de la créatine kinase, de la lactate deshydrogénase, des transaminases, la biopsie musculaire, l'électromyogramme et l'enquête familiale répondent à ce critère.

– "La morbidité de la maladie doit justifier le screening".

Dans le terme de morbidité il faut distinguer :

. la gravité de la maladie. Sur ce point la réponse est indiscutable.

. l'incidence de la maladie : les données à ce sujet sont très variables selon les auteurs et les régions (tableau 1) (25).

Nos chiffres rapportés au chapitre IV. montrent que l'incidence de la maladie est telle (1/5000) qu'elle justifie le dépistage.

– "Une fois que la maladie a été confirmée, il doit exister un traitement efficace qui puisse être mis en oeuvre". La myopathie ne correspond pas à ce critère fondamental, car il n'existe pas de traitement. Donc, contrairement aux autres programmes, le coût du dépistage de la DMD ne peut être justifié par la mise en oeuvre d'une thérapeutique efficace, bien que la précocité du traitement

symptomatique (physiothérapie et la balneothérapie) ralentiraient l'évolution de la maladie comme l'a montré DEMOS en 1971 (44).

Cependant si le principe du dépistage peut être controversé (61-62) sur le plan théorique, le malade ne pouvant bénéficier d'un traitement, il paraît difficile de contester le bénéfice que peut en recueillir la famille sur le plan matériel (les parents peuvent prévoir des conditions d'habitation adaptées à la vie d'un handicapé) et surtout sur le plan psychologique. En effet une enquête de BECKMANN et al. (9, 10). (Communication personnelle : Jérusalem 1976) montre que 87,5 % (240 réponses sur 280 questionnaires) des parents d'au moins un enfant myopathes auraient souhaité savoir le plus tôt possible que leur fils serait malade, afin de pouvoir le traiter dès le début (88,8 % des cas) et afin de ne plus avoir d'autres enfants malades (60,8 % des cas).

Il faut en effet souligner que 20 % des garçons myopathes sont les frères d'un aîné malade (7, 161).

Certains auteurs, cependant, parmi lesquels DUBOWITZ (60, 62) considèrent que l'information génétique qui fait suite à la confirmation de la maladie ne justifie pas le dépistage systématique.

Comme WHARTON (212) et GILBOA et al. (72) il propose que le dépistage soit limité aux familles dites "à haut risque".

Ces auteurs considèrent que le conseil génétique a un intérêt limité, car ils admettent classiquement que 2/3 des mères d'enfants myopathes sont conductrices (18, 140), et que le diagnostic ne peut être affirmé que chez environ 80 % d'entre elles par la mesure de l'activité de la CK dans le sérum (142, 187) et par d'autres examens proposés dans la littérature.

Cependant une étude récente de ROSES (173) portant sur 41 familles montre qu'il existe une augmentation de l'activité de la CK ou de l'isoenzyme 5 de la lactate deshydrogenase (LDH) chez une femme apparentée à la mère dans 39 cas sur 41.

Or l'apparition d'une mutation chez une mère dont, une tante, une soeur ou une cousine possède une activité de CK ou de LDH₅ élevée semble difficile à admettre.

Ainsi d'après ROSES (173), il faut considérer toutes les mères d'enfants atteints de DMD comme conductrice jusqu'à ce que la preuve du contraire ait été faite.

De plus, cette information génétique est efficace :

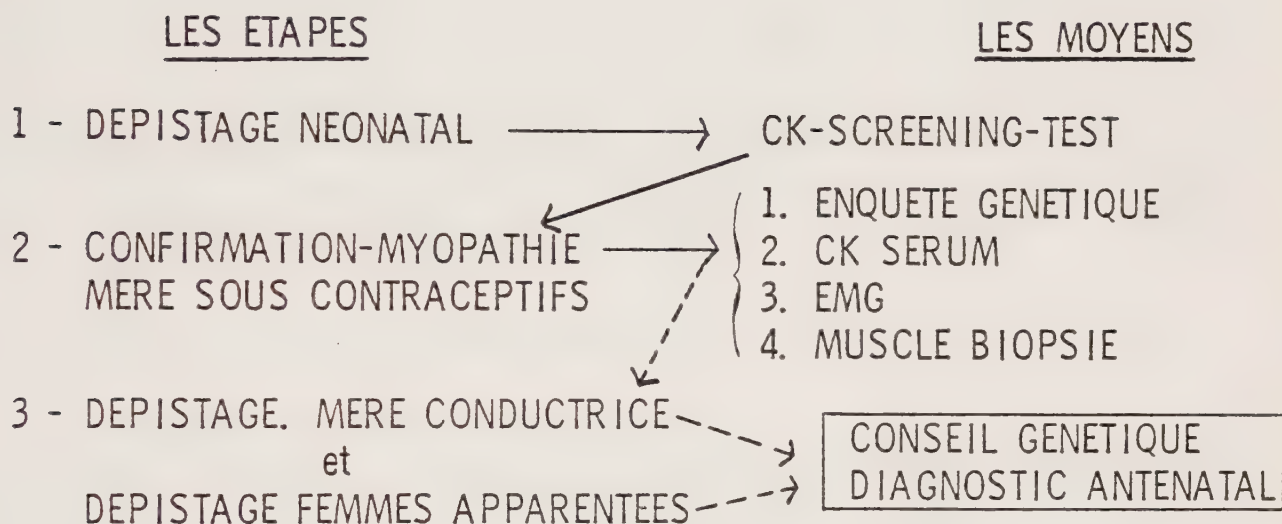
- En 1972 EMERY et al. (69) rapporte que sur 41 femmes "à haut risque" et informées,
 - . 36 décident de ne plus avoir d'enfants
 - . 2 optent pour l'avortement sélectif des fœtus mâles
 - . 2 ne tiennent pas compte du conseil génétique.

— En 1976, l'enquête réalisée par HUTTON et al. (88) montre que 81 % des 105 mères conductrices recensées, prévoient de ne plus avoir d'enfants et que 55 % d'entre elles optent pour une stérilisation chirurgicale, soit de leur conjoint, soit d'elles même.

Bien que sa portée soit limitée, le Conseil Génétique précoce est efficace : il permet : (7, 161).

Schéma n° 1

LES ETAPES DU DEPISTAGE SYSTEMATIQUE
NEONATAL
AU
CONSEIL GENETIQUE PRECOCE



1) de préparer la famille à accueillir un enfant qui deviendra un handicapé moteur, et de mettre rapidement les parents en relation avec les structures sociales spécialisées dans les soins et l'éducation d'un enfant myopathe.

2) de rechercher si la mère est conductrice ou non en confrontant les résultats de l'enquête familiale avec ceux des examens para-cliniques et diagnostiquer le trait de conductrices chez la mère et les apparentées. Il est évident que la **précocité** du diagnostic de DMD chez un premier garçon peut être l'élément déterminant qui permettra une information génétique efficace auprès des autres membres de la famille - évitant ainsi la naissance d'un cousin germain myopathe - ou d'un petit frère myopathe.

GARDNER-MEDWIN (71) rapporte le cas de deux familles chez lesquelles le diagnostic précoce de DMD aurait évité la naissance de frères cadets myopathes.

En effet, actuellement le conseil génétique semble être notre principale arme dans la lutte contre la myopathie de DUCHENNE de BOULOGNE.

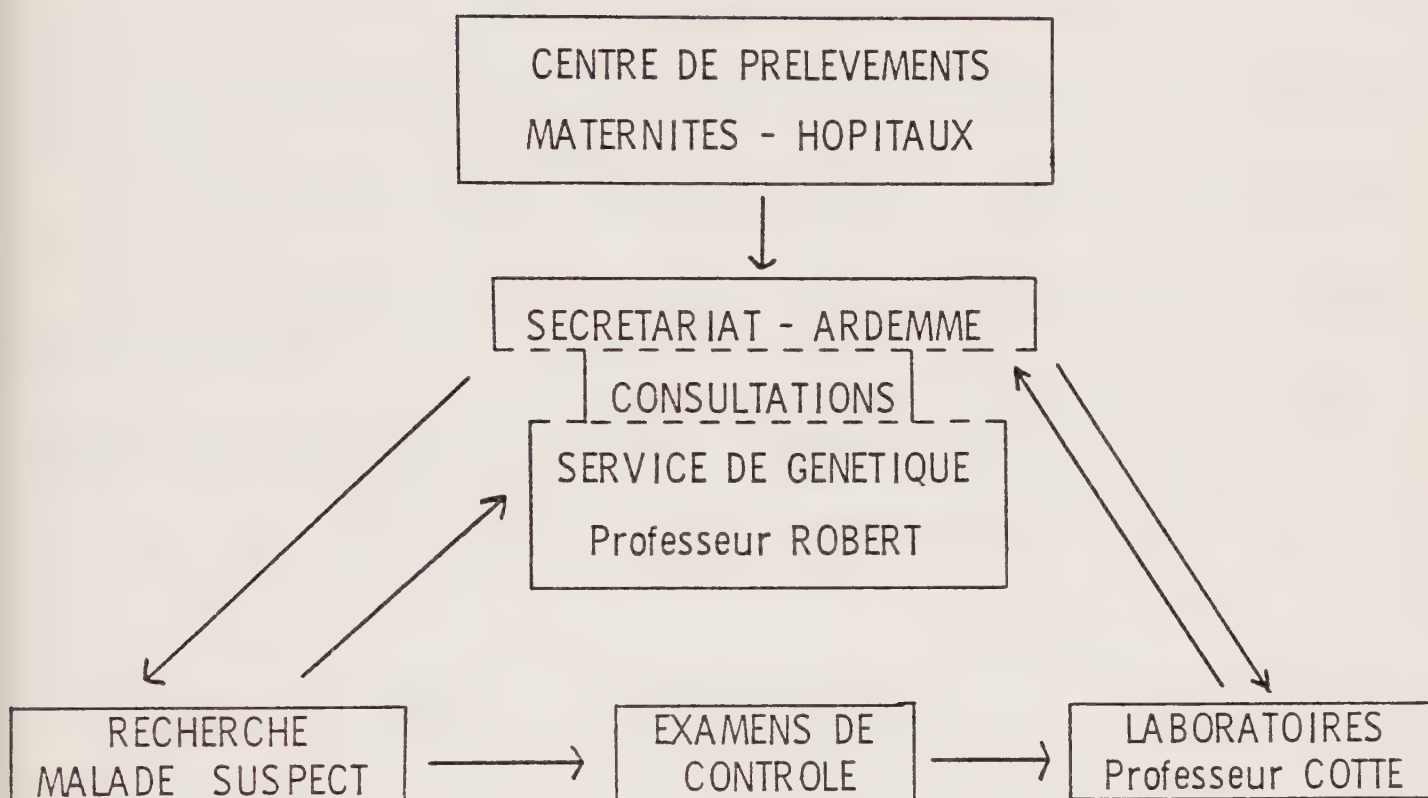
Le conseil génétique aurait une répercussion évidente sur l'incidence de la myopathie comme le montre HUTTON (88) dont les résultats confirment ceux de HURSE et KAKULAS (87) qui ont observé une diminution de la fréquence de la myopathie dans l'ouest de l'Australie de 21 cas pour 100.000 naissances mâles entre 1960 et 1964, à 7 cas entre 1965 et 1969. Donc il semble bien que même en l'absence de traitement, le mode de transmission, permet un dépistage efficace sur un plan préventif à long terme. Ces données sont contredites par les résultats de l'enquête de BROOKS et EMERY (25) qui n'ont pas observé de modification de l'incidence de la DMD dans le Sud-Est de l'Ecosse entre 1953 et 1968. Cependant, comme le soulignent ces auteurs la détection des femmes transmettrices n'est pratiquée que depuis 1960.

Il est certain que le conseil génétique est le fondement de toutes les étapes qui font suite au dépistage (schéma n° 1).

Le généticien a une tâche extrêmement difficile car il doit informer la famille que l'enfant sera malade dans les années à venir, sans pouvoir proposer de traitement. De plus, le généticien doit demander que d'autres membres de la famille viennent en consultation de génétique. On conçoit toutes les difficultés d'ordre psychologique que cela peut entraîner à tous niveaux.

Une organisation de dépistage de la myopathie doit donc être centrée sur un service de génétique.

Les structures du centre de dépistage de la Région Rhône-Alpes, répondent à ce critère, le service de génétique ayant un rôle central.

Schéma n° 2FONCTIONNEMENT DU CENTRE DE DEPISTAGE
DE LA MYOPATHIE DE DUCHENNE

3. ORGANISATION DE L'ASSOCIATION REGIONALE POUR LE DEPISTAGE ET L'ETUDE DES MALADIES METABOLIQUES DE L'ENFANT (ARDEMME).

Le centre de dépistage des maladies congénitales a été créé à Lyon en 1969 dans le cadre de l'Association régionale pour le dépistage et l'étude des maladies métaboliques de l'enfant.

Son activité centrée à l'origine sur le dépistage de la phénylcétonurie, (54) s'étend sur les départements de la région Rhône-Alpes et recouvre 98 % des naissances.

Le Centre de Lyon regroupe les départements du Rhône, de la Loire, de l'Ain et de l'Ardèche, et assure le dépistage d'environ 40.000 naissances par an. (53, 94).

Le fonctionnement (schéma n° 2) du centre de dépistage est le suivant (50) :

1) Les centres de prélèvements adressent l'échantillon de sang par la poste au secrétariat de l'ARDEMME où a lieu l'enregistrement.

2) Le secrétariat envoie les prélèvements au laboratoire de dépistage (Hôpital Debrousse - Laboratoire du Professeur COTTE).

3) Le laboratoire retourne les résultats du test au secrétariat de l'ARDEMME où ils sont archivés et exploités.

4) Le secrétariat entre en relation avec les familles par l'intermédiaire des DASS ou des médecins, pour obtenir un second prélèvement afin de contrôler le résultat .

5) Une consultation, et un examen de contrôle sont proposés aux familles.

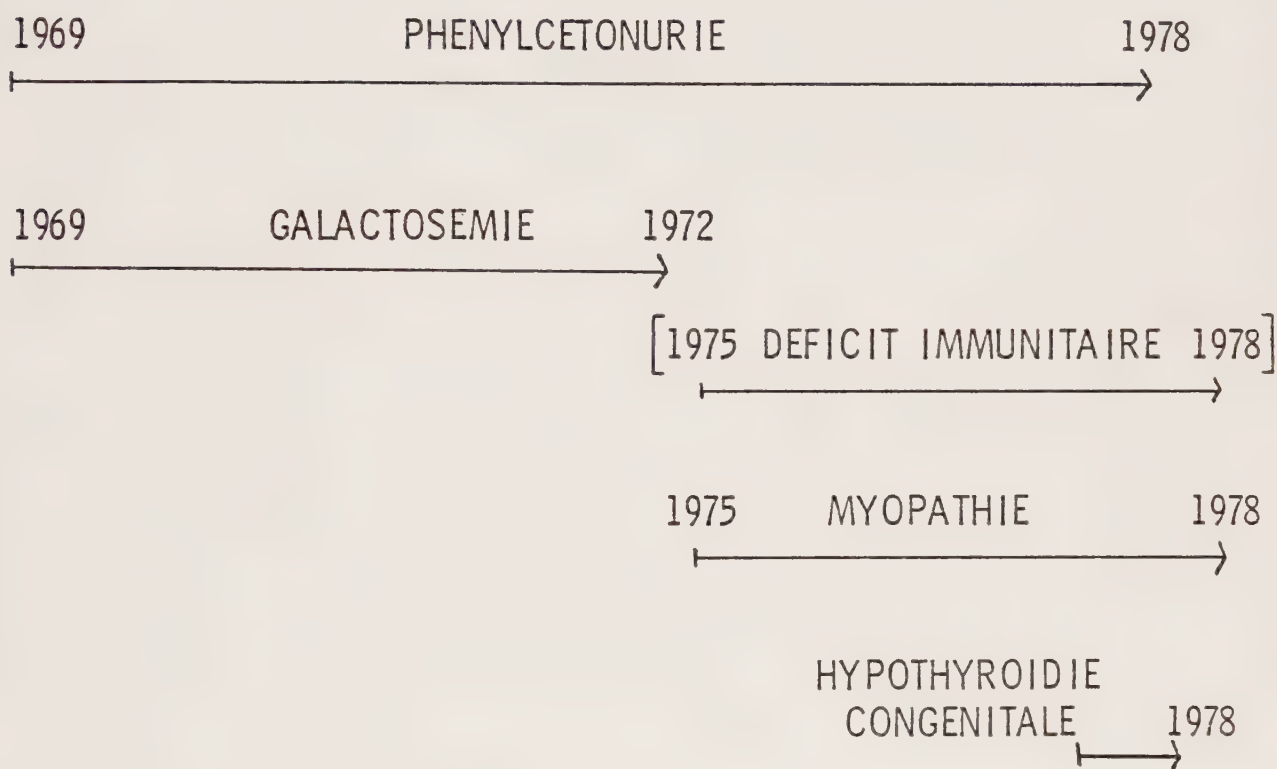
TABLEAU N° 2

RESULTATS DES DEPISTAGES NEONATAUX ENTREPRIS A L'HOPITAL DEBROUSSE DEPUIS 1969

MALADIES	Nombre de tests réalisés	Nombre de cas Dépistés	Fréquence obtenue.
Phénylcétonurie (54)	262.000	10	1/26.000
Galactosémie (52)	31.041	1	—
CID lié à un déficit en ADA. (53)	99.285	0	0
Hypothyroïdie congénitale (53).	37.000	10	1/3.700

CID : Déficit Immunitaire Combiné

ADA : Adénosine Désaminase.

Schéma n° 3DEPISTAGES NEONATAUX ENTREPRIS DEPUIS 1969
PAR L'ARDEMME

L'organisation de l'ARDEMME, son implantation et sa souplesse, ont permis d'entreprendre plusieurs programmes indépendants de dépistage. (schéma n° 3).

Les résultats obtenus sont portés dans le tableau n° 2.

En 1975, en collaboration avec le Docteur SCHEUERBRANDT et sous l'impulsion du Professeur ROBERT, nous avons personnellement entrepris au sein du laboratoire de dépistage de l'Hôpital Debrousse, dirigé par le Professeur J. COTTE, le dépistage systématique de la DMD utilisant les prélèvements réalisés systématiquement pour le dépistage de la phénylcétonurie.

En effet, les caractéristiques du test de screening proposé (chapitre I) permettent la réalisation des deux examens en parallèle sur le même prélèvement.

★○★

CHAPITRE I.

*

CARACTERISTIQUES DU TEST.

I.- 1. CONDITIONS DE PRELEVEMENT.

Le prélèvement de sang du cordon a été proposé pour le dosage de la CK chez le nouveau-né. GRIFFITHS (77) sur 39 prélèvements après traumatisme obstétrical, constate 8 élévations importantes des taux de CK.

Une étude ultérieure sur 95 cas (79) ne confirmait pas de corrélation systématique entre le taux de CK et le traumatisme. Cependant, lorsque la CK est élevée, son activité peut atteindre des valeurs rencontrées dans la DMD.

Ces résultats interdisent logiquement l'utilisation du sang du cordon pour ce type de dépistage.

Sur le sang capillaire, différents auteurs (30, 165, 174) ont montré une corrélation assez nette entre l'anoxie et l'élévation des CK. Ces résultats ont par ailleurs été confirmés par BODENSTEINER et ZELLWEGER (20) qui ont utilisé du sang capillaire.

Cependant GILBOA et SWANSON (72) ont obtenu chez certains nouveaux-nés normaux des activités de CK dix fois supérieures à celles des adultes.

Ces taux très élevés (variant de 56 à 803 UI - moyenne 263 UI) dans le sang capillaire reviennent à une valeur de 100 UI après 4 jours de vie.

Ces auteurs ont montré que le taux de CK retournent au taux normal de l'adulte à l'âge de 6 à 10 semaines. GILBOA et SWANSON (72) proposent que le prélèvement en vue du screening de la DMD, soit pratiqué à cette période.

En conclusion, le prélèvement de sang du cordon peut présenter des causes d'erreurs possibles. De plus sa viscosité pourrait conduire à une répartition très hétérogène sur le support en papier.

Dans le sang capillaire, comme l'on montré GILBOA et SWANSON (72), les valeurs anormalement élevées à la naissance reviennent à 2 fois la valeur normale au 4ème jour de la vie. La conclusion de GILBOA et SWANSON rejetant un prélèvement à cette période, n'est pas justifiée. ~ En effet, les taux de CK retrouvés dans la DMD sont à la naissance, selon DEMOS (44, 46) 20 à 100 fois supérieurs aux taux normaux. Cet écart est suffisamment important pour ne pas interférer sur le seuil de détectabilité des cas positifs dont les taux restent très supérieurs aux taux les plus fréquents du 4ème jour de la vie.

De ce fait, le prélèvement peut être réalisé en même temps que celui destiné au dépistage

Date : _____
N° : _____

A ne pas remplir

(1) Ecrire en capitales d'imprimerie.
Utiliser un stylo à bille pour compléter la fiche.

Maternité : _____ Code :

Médecin Accoucheur : _____

Nom de l'enfant (1) :

Prénoms _____ Prématuré ☐

Adresse : _____

Date de naissance : _____ Sexe : _____

Date de prélèvement : _____

Poids de naissance : _____

Normal		
RESULTATS	PHENYLALANINE	TYROSINE
à suivre		

Adresser à :

ARDEMME
Service de Génétique
HOTEL-DIEU

69002 LYON

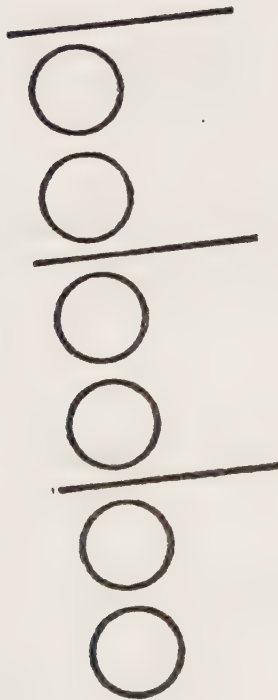


Fig 1

CARTE DE PRELEVEMENT

de la phénylcétonurie et de l'hypothyroïdie congénitale, entre le 4ème et le 8ème jour de la vie, avant la sortie de l'enfant de la maternité.

I - 2. TECHNIQUE DE PRELEVEMENT (19, 52).

I - 2.1. Matériel.

- microlance (le modèle 57 52 F fabriqué par BECTON-DICKINSON convient très bien)
- désinfectant non iodé,
- tampon gaze stérile
- cartes de prélèvement constituées d'un support en papier SCHLEICHER et SCHUELL N° 903 fixé sur une fiche d'identification où sont mentionnées les consignes de prélèvement et d'expédition (cf. figure 1).

I - 2.2. Technique.

Il s'agit de la technique classique des prélèvements de sang capillaire chez le nouveau-né :

- Désinfecter le talon avec le tampon imbibé d'un désinfectant non iodé (nous avons montré que la présence d'iode à très forte dose, peut inhiber légèrement la réaction. (§ III.3.6.)
- Laisser sécher
- Piquer franchement
- Recueillir une goutte de sang en évitant de presser sur le talon (un traumatisme des tissus musculaires risque de provoquer une élévation du taux de CK).
- Laisser sécher.

Précaution : la goutte de sang doit complètement traverser la carte.

Ne pas déposer plus d'une goutte sur la même surface (effet de surcharge)

Ne pas recueillir une goutte de sang sur le bord du papier.

I - 2.3. Envoi au laboratoire.

Ce prélèvement peut être adressé au laboratoire par voie postale dans une enveloppe ordinaire.

I - 3. CONSERVATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.

Nous l'envisagerons rapidement ci-dessous. Une étude plus complète est présentée dans le paragraphe III.3.7.

En 1970 BODENSTEINER et ZELLVEGER (20) ont montré que les activités enzymatiques du sérum se conservent bien quand le sang est stocké, séché sur un support de papier. On savait que les enzymes érythrocytaires comme le Glucose-6-phosphate-deshydrogénase (EC. 1. 1. 1. 49.) se

conservent bien à la température de la pièce sous cette forme. (52). La créatine kinase est la première enzyme sérique qui a été étudiée à partir d'un prélèvement de sang séché sur un support de papier.

D'après DALAL (37), la CK subit dans le sérum deux types d'inactivation.

- une inactivation irréversible, dont la CK serait protégée par la présence d'albumine,
- une inactivation réversible, par l'oxydation des groupements thiols. Cette inactivation serait causée par une ou plusieurs substances qui existeraient dans le sérum, sous forme libre ou liée aux protéines (ce peut être le calcium).

Nous avons montré que la conservation de l'activité de la CK est bien meilleure dans un milieu anhydre que dans un milieu aqueux. (cf. § III.3.7.).

THOMSON (205) montre que le rôle de la lumière sur l'inactivation de la CK est important. Il observe une perte de 25 % de l'activité en exposant le sérum 20 minutes à la lumière du jour.

HWANG (89) en exposant 8 jours le prélèvement sur support de papier à une lumière ultra-violette, note une perte de seulement 7 % de l'activité de départ.

La lumière peut intervenir sur la stabilité de l'enzyme par la formation d'oxygène moléculaire qui oxyde les doubles liaisons. La mobilité de cet oxygène serait beaucoup plus faible en milieu séché, que liquide. De plus les érythrocytes auraient un effet écran contre la lumière.

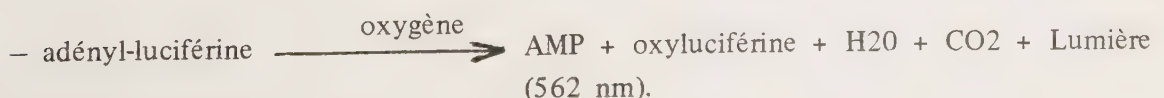
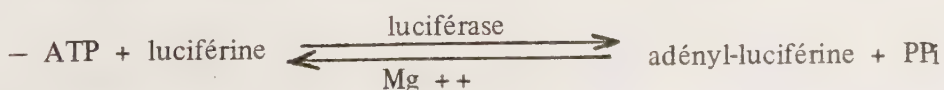
Les essais rapportés par HWANG (89) et nos essais personnels (cf. III.3.7.) montrent que la conservation à 25°C pendant 10 jours entraîne au maximum une perte de 25 % de l'activité de départ. Le réactivateur des groupements Thiols utilisé dans le test proposé, est le DITHIOTREITOL (DTT). Dès 1975, MIYADA et DINOVO (135) ont confirmé que le DTT est un des meilleur réactivateur de CK avec le mercaptoethanol.

I - 4. PRINCIPE DE LA REACTION.

Une pastille de papier imprégnée de sang séché contenant la créatine kinase est ajoutée à une solution tamponnée qui contient de la luciférine-luciférase, du DTT et de l'ADP. Cette préincubation de 24 Heures permet :

- l'élution du sang,
- la réactivation de la créatine kinase par le DTT,
- la consommation de l'ATP préexistant dans le prélèvement.

Dans un deuxième temps, on rajoute de la créatine-phosphate et les réactions suivantes produisent la bioluminescence que l'on mesure.



— ADA : Adénosine Désaminase (E.C.3.5.4.4.)

La quantité de lumière émise est fonction de l'activité de la créatine kinase apportée par l'échantillon.

I - 5. MATERIEL.

- une pince emporte-pièces de 1/8 de pouce de diamètre, permettant de découper des pastilles renfermant une quantité de sang correspondant à 4 microlitres de sang frais (x)
- un agitateur type "VORTEX",
- des tubes de verre à usage unique à fond rond de 6 à 6,5 mm de diamètre, d'une longueur de 50 mm et d'une épaisseur de 0,4 mm.
- un portoir de 300 trous correspondant aux dimensions des tubes.
- des pipettes BECKMAN permettant de distribuer 50 et 200 microlitres.
- un spectrophotomètre CHEM GLOW AMINCO (référence N° 4-7441) muni d'un porte tubes de 6 x 50 mm. Cet appareil est spécialement adapté à la mesure de la bioluminescence et peut être éventuellement muni d'un enregistreur.

(x) emporte-pièce GEM - Me GILLCO - MARENGO ILL
PATS. 208.163 2735 492.

L'emporte-pièce découpe une pastille de 1/8e de pouce, soit :

25,4
—— = 3,2 mm de diamètre : ce qui représente une surface de 8 mm². Si la charge de sang est homogène, 40 microlitres de sang se répartissent sur un cercle préimprimé de 1 cm de diamètre, soit 78,5 mm² de surface. Donc 8 mm² représentent 4 microlitres environ de sang frais.

I - 6. REACTIFS.

Les réactifs sont fournis par les laboratoires ANTONIK (599, EXMOOR Road, ELK GROVE VILLAGE, ILLINOIS, 60007, USA). La représentation en Europe est assurée par le Docteur SCHEUERBRANDT, CK-TEST-LABORATORIUM IM TALGRUND 2 - 7821 BREITNAU BEI FREIBURG.

— Le réactif A une fois reconstitué par le volume adéquat d'eau distillée (suivant les indications du fabricant) contient :

- . luciférine-luciférase : 3,3 g/litre d'organes lumineux séchés de lucioles.
- . acétate de magnésium : 0,02 M
- . ADP : 0,1 mM
- . Dithiothreitol : 1,0 mM
- . Tampon acide Morpholinopropane sulfonique 0,05 M pH 7,3

- Le réactif B une fois reconstitué contient :
 - . Créatine phosphate : 0,1 M
 - . tampon acide morpholinopropane sulphonique 0,05 M à pH 7,3.

Conservation des réactifs à + 4° C.

I - 7. REALISATION DU TEST.

Des échantillons témoins positifs obtenus chez un sujet atteint de DMD et conservés à + 4° C sans précaution spéciale, sont incorporés dans chaque série d'analyse.

– Découper une pastille de sang séché et la laisser tomber au fond du tube. (prévoir deux tubes témoins "positifs" et deux tubes sans pastille, permettant de réaliser le zéro du spectrophotomètre).

– Reconstituer le réactif A et le réactif B avec un volume adéquat d'eau distillée

– Répartir le réactif A à raison de 200 microlitres par tube

– Laisser 15 minutes à la température du laboratoire,

– Agiter les tubes au Vortex,

– Laisser la réaction de consommation de l'ATP préexistante se dérouler 24 heures à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière,

– Répartir le réactif B à raison de 50 microlitres par tube. Cette répartition est réalisée d'une manière séquentielle à raison de 10 tubes par minute. Ainsi, en 30 minutes, 300 tubes sont traités.

– Dès que le dernier tube est traité, photométrer le blanc et régler le zéro du photomètre.

– Photométrer séquentiellement les tubes à raison de 10 tubes par minute.

– Les résultats obtenus sont exprimés en unités arbitraires "Unité Lumière" (UL) correspondant à l'appareil utilisé (ces unités sont portées sur le cadran).

Par ses conditions de prélèvement, de transport, et par la réaction mise en oeuvre, le test de screening est donc simple, bon marché (environ 1 Dollar) et facile à réaliser sur des petits échantillons de sang, facilement prélevés. Ces échantillons sont stables pendant la durée du transport au laboratoire.

On peut donc admettre qu'il existe pour le dépistage de la DMD, un test de screening dont les qualités répondent aux recommandations que le Comité "Foetus and Newborn" de l'académie américaine de Pédiatrie a définies(35).

Comme nous l'avons vu, la deuxième recommandation concerne la sensibilité du test :

"Le screening doit être suffisamment sensible pour identifier tous les cas. Il peut y avoir un certain nombre de cas faux-positifs, mais aucun cas faux-négatif".

La réaction mise en oeuvre, basée sur l'augmentation de l'activité enzymatique de la CK est couplée à la réaction "luciférine-luciférase" qui révèle, par la production de bioluminescence, l'ATP formée au cours de la réaction de la CK. La sensibilité de la réaction globale dépend de la sensibilité de la réaction ATP - LL.

Il nous a donc paru intéressant d'exposer :

- les méthodes de préparation des réactifs LL,
- les mécanismes de la réaction de bioluminescence ATP - LL
- le rôle des composés mis en présence au cours de la réaction,
- l'intérêt d'employer, malgré de nombreuses réactions interférantes, un réactif non purifié.
- enfin, les performances de la réaction de couplage et plus particulièrement sa sensibilité.



CHAPITRE II.

*

LA REACTION DE BIOLUMINESCENCE
LUCIFERINE – LUCIFERASE – ATP (LL/ATP)
(E.C. 2. 7. non défini)

Nous envisagerons l'étude de la réaction proposée par ANTONIK (2) en développant plus particulièrement, les mécanismes de la réaction de bioluminescence, l'influence des autres systèmes enzymatiques apportés dans la préparation non purifiée que nous utilisons.

Nous ne présenterons qu'un très bref rappel de généralités sur la créatine-kinase (EC. 2. 7. 3. 2.).

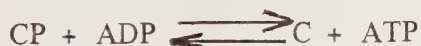
II - 1. RAPPEL DE GENERALITES SUR LA CREATINE-KINASE (EC. 2. 7. 3. 2.)

II - 1.1. Réaction catalysée.

La créatine-kinase (CK) ou créatine-phosphokinase (CPK) fut découverte en 1934 par LOHMANN qui montra qu'elle catalyse la réaction :



Cette réaction est réversible et on peut l'écrire de la façon suivante :



Cependant, la seule réaction utilisée afin d'évaluer l'activité de la CK, fait appel à l'ADP comme accepteur de phosphate. La créatine-phosphate est toujours le donneur de phosphate, substrat spécifique de la CK (144) (cf. schéma 4).

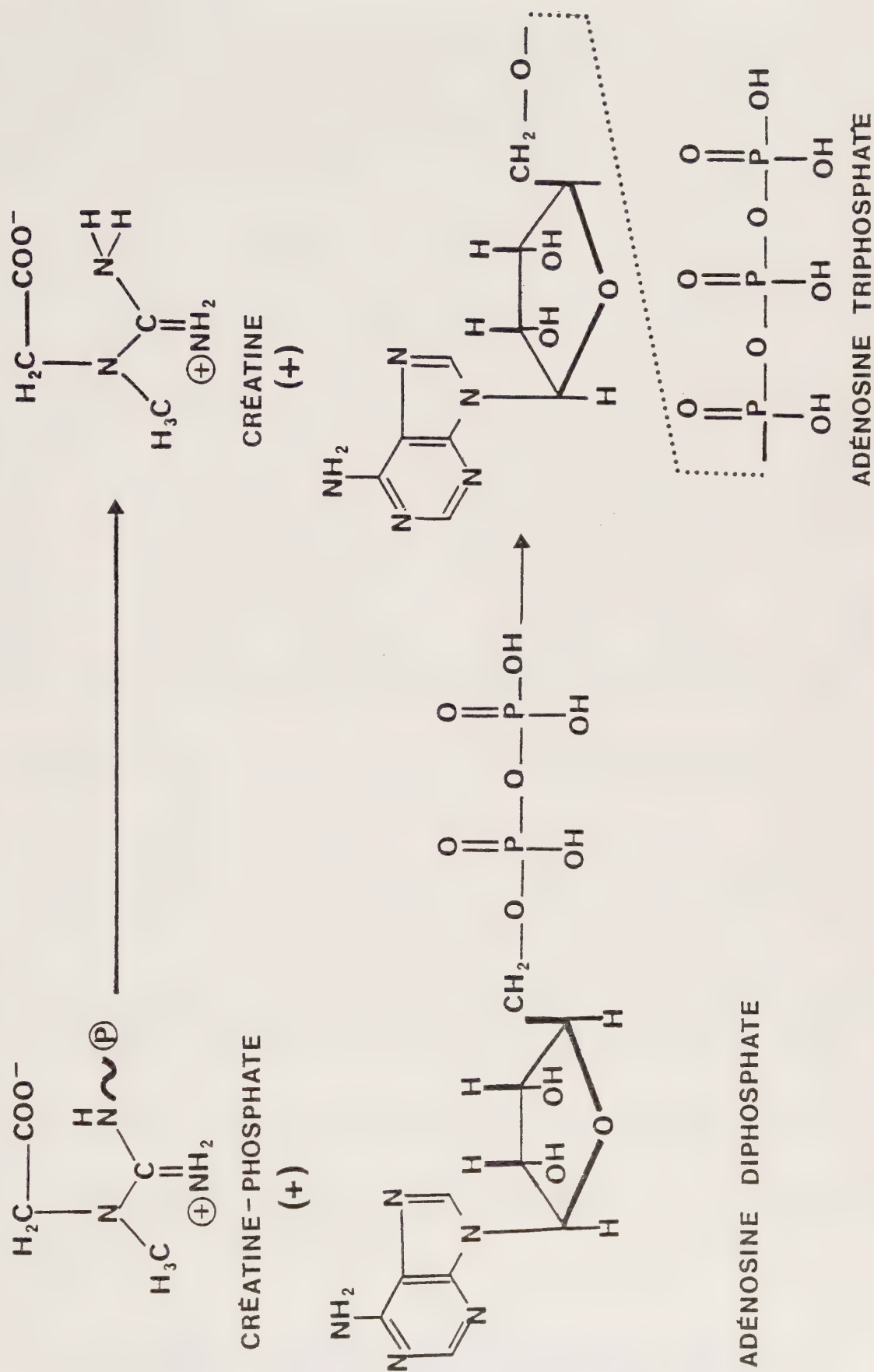
II - 1.2. Propriétés physico-chimiques de l'enzyme purifiée (98 - 144).

La CK cristallise en aiguilles fines dans un mélange éthanol / eau (60/40) à pH 9,0. (101).

- Masse moléculaire : 81000 d (103),
- pH isoélectrique : 6,1 (102),
- pH optimum de la réaction de phosphorylation à 38° C en tampon glycine : pH = 9,0.
- pH optimum de la réaction inverse à 38° C en tampon glycylglycine pH = 7,0.
- Activateurs : Mg^{++} , Mn^{++} ,

SCHEMA 4

REACTION CATALYSEE PAR LA CREATINE KINASE



- Inhibiteurs : Zn^{++} , Cu^{++} , composé “phosphate”, ortho-phosphate, et poly-phosphate, chlorure, sulfate, acétate, et d’autres composés tel la dibénamine, la phénothiazone et le 3,5-dinitro-crésol, le para-mercuri-benzoate, le iodoacétate,
- Stabilisateurs : réactifs stabilisant les groupements thiols. (5)
- constante de Michaelis (tableau n° 3).

TABLEAU N° 3
CONSTANTE DE MICHAELIS DE LA CK

SUBSTRAT	Km (M)	Conditions opératoires
ATP	5×10^{-4}	pH 8,8 - 9
Créatine	$1,6 \times 10^{-2}$	tampon glycine
Mg ²⁺	6×10^{-4}	30° C
ADP	8×10^{-4}	pH 7,0
Phosphocréatine	5×10^{-3}	tampon glycylglycine
Mg ⁺⁺	2×10^{-3}	30° C

Ces constantes de Michaelis ont été calculées sur de la créatine kinase extraite du muscle de lapin (103).

- Spécificité : le substrat de phosphorylation est la créatine (N-méthylglycocyamine), seule la N-éthylglycocyamine et la glycocyamine peuvent jouer le rôle d’accepteur du groupement phosphate. La créatinine, l’arginine, l’histidine et la taurocyamine sont inactives (144).
- ni l’AMP, ni l’ADP ne peuvent remplacer l’ATP comme donneur du groupement phosphate.
- Stabilité : l’oxydation des groupements thiols qui sont au voisinage du site actif, serait à l’origine de la très grande instabilité (37).

II - 1.3. Isoenzymes (138).

L’étude des propriétés et des structures de l’enzyme a permis de caractériser diverses formes moléculaires. La CK est un dimère constitué de deux monomères de type M (muscle) ou de type B (brain : cerveau en anglais) qui associés, conduisent à trois isoenzymes dimériques :

- le dimère MM est retrouvé dans les muscles,
- le dimère MB est retrouvé dans le tissu cardiaque,
- le dimère BB est retrouvé dans l’encéphale.

La CK, de par sa fonction, est présente dans les tissus nécessitant une libération rapide d'énergie.

Quelque soit la nature de l'isoenzyme, donc du tissu concerné, la créatine kinase est surtout présente au niveau du cytoplasme. Dans le muscle cependant, une faible partie est liée aux membranes mitochondriales (149).

Cette différenciation des structures permet de connaître l'origine de l'enzyme dans le milieu biologique étudié. (167). De nombreuses méthodes physico-chimiques permettent la séparation et l'identification des trois iso-enzymes. Parmi celles-ci, l'électrophorèse développée par MORIN (137), la chromatographie sur résine échangeuse d'ions (110, 133, 202) ont une place privilégiée.

D'autres méthodes sont moins courantes :

- méthodes cinétiques (158 - 215)
- méthodes immunologiques (95).

L'isoenzyme MM est responsable de l'augmentation de l'activité de la CK dans le sérum des enfants myopathes.

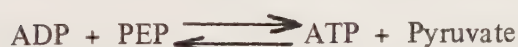
II - 1.4. Détermination de l'Activité Enzymatique (75 - 132).

On ne connaît pas de méthode directe d'évaluation de l'activité de la Créatine kinase. Aussi une réaction révélatrice est elle obligatoire. Les méthodes sont classées en fonction du composé dosé dans la réaction révélatrice.

II - 1.4.1. Conditions opératoires telles que la réaction se développe dans le sens :



* L'ADP formé est dosé par une réaction couplée.



(PEP = phospho-enol-pyruvate)

Le pyruvate est dosé :

– soit par la réaction :



La mesure de disparition du NADH est appréciée par spectrophotométrie (204).

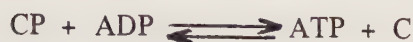
– soit par la réaction :



DNPH = dinitrophenylhydrazine.

* La créatine-phosphate est dosée par hydrolyse : le phosphore inorganique libéré est dosé par la méthode de FISKE et SUBBAROW (102).¹

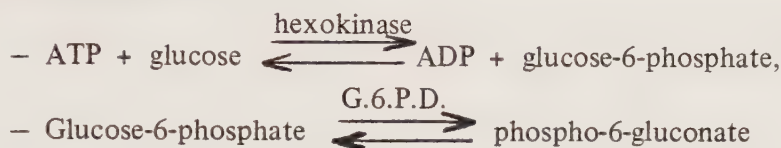
II - 1.4.2. Conditions opératoires telles que la réaction se développe dans le sens :



* La créatine est dosée :

- soit par colorimétrie avec l'alpha naphthol diacétyl (70, 168, 166),
- soit par fluorescence avec la ninhydrine (100, 175).

* La méthode proposée par la SFBC (129) a pour principe le dosage de l'ATP par les réactions couplées suivantes :



G6PD : glucose-6-phosphate deshydrogénase. .

La vitesse d'apparition du NADPH est suivie spectrophotométriquement par la mesure en continu de la variation d'absorbance mesurée à 340 nm. (147). La cinétique des trois réactions enzymatiques a été étudiée (105).

La production d'ATP peut être également révélée par une réaction originale qui utilise le système enzymatique : Luciférine-Luciférase (LL).

Cette méthode d'évaluation d'activité de la CK a été proposée par WITTEVEEN et al. (215) en 1974.

Plus récemment, LEE et al. (107) ont décrit une technique dans laquelle la Luciférase est fixée sur un support solide.

La technique que nous utilisons fait appel au même système de révélation de l'ATP (2).

Nous avons tenté d'aborder l'étude de cette réaction, qui, par son originalité, mérite d'être développée plus particulièrement.

Nous envisagerons successivement :

- la préparation des réactifs,
- les mécanismes d'action,
- l'influence de la pyrophosphatase (EC. 3. 6. 1. 1.) et de l'adénylate-kinase ou myokinase (EC. 2. 7. 4. 3.) qui sont présentes en grande quantité dans le réactif brut,
- enfin les conditions d'optimisation de la réaction ATP/LL.

II - 2. LA REACTION DE BIOLUMINESCENCE : HISTORIQUE - DEFINITION (180)

Une molécule est électroniquement excitée quand l'un de ses électrons est déplacé de son orbite normale vers une orbite de rang plus élevé. Ce mécanisme requiert un apport d'énergie.

Quand un atome ou une molécule retombe d'un état électroniquement excité à son état fondamental énergétiquement plus bas, de la lumière est émise.

Ce mécanisme requiert un apport d'énergie :

— on parlera d'incandescence si l'excitation est provoquée par un apport d'énergie thermique à la suite duquel les niveaux d'énergie atteints par les électrons seront fonction de la température, c'est-à-dire de l'agitation moléculaire,

— à cette absorption d'énergie sans spécificité, on peut opposer une absorption d'énergie quantifiée et sélective d'un niveau donné. La rencontre d'un photon d'énergie donnée avec les électrons d'une molécule peut aboutir à placer un de ces électrons sur une orbitale jusque là inoccupée et dont le niveau énergétique diffère du niveau de base par une quantité égale à l'énergie du photon absorbée. D'une manière plus générale on emploiera le terme de luminescence pour toutes les excitations sélectives.

Contrairement à l'incandescence au cours de laquelle une grande partie de l'énergie qui sert à peupler les états excités est restituée sous forme de chaleur, la luminescence a un rendement énergétique assez élevé et l'élévation de température est négligeable.

Lorsque l'excitation est produite par l'absorption d'un photon la luminescence prend le nom de fluorescence ou phosphorescence.

Lorsque l'excitation est produite par l'absorption d'un quantum d'énergie thermique libéré par une réaction chimique exergonique, on utilise le terme de "chimiluminescence". Dans le cas particulier de la bioluminescence, les composantes de la réaction sont d'origine biologique (enzyme et substrats). Il faut noter que l'énergie requise pour l'émission d'un photon dans le domaine visible est considérable : 45 à 65 K cal selon la longueur d'onde. (A titre de comparaison, l'hydrolyse du phosphate terminal de l'ATP ne fournit que 8 K cal par mole).

Ces réactions diffèrent des réactions chimiques habituellement rencontrées par le fait que le produit de la réaction qui est mis en évidence ne s'accumule pas dans le milieu réactionnel.

L'intensité de la bioluminescence dépendra du nombre de photons émis par unité de temps - ce qui correspond à la cinétique chimique ou enzymatique des réactions habituellement rencontrées en biochimie. L'étude de la bioluminescence eut comme point de départ une observation de "Sciences naturelles".

En 1887, Raphaël DUBOIS, "savant" lyonnais, étudiait la bioluminescence émise par un mollusque bivalve foreur : la PHOLADE (*Pholas dactylus*) autrefois abondant le long des côtes atlantiques et méditerranéennes. Il découvrit ainsi une substance relativement stable à la chaleur qu'il appela "Luciférine". (58).

Le produit d'oxydation de cette substance cellulaire est dans un état électronique excité et émet un photon en revenant à l'état fondamental.

Raphaël DUBOIS montra que la réaction d'oxydation ne peut se produire qu'en présence d'une substance thermolabile qu'il appela "Luciférase". En effet, la luminescence d'un extrait de pholade dans l'eau froide, s'éteint peu à peu, mais réapparaît quand on introduit un extrait bouilli. HARVEY en 1914 fait une observation similaire en travaillant sur une luciférase bactérienne : *Photobacterium fischeri* ou *Achromobacter*. (81).

Aujourd'hui plus de 20 systèmes biologiques différents provoquant une émission lumineuse, ont été décrits (82).

La réaction générale est :



LH2 = luciférine

oxy Lx = luciférine oxydée à l'état excité

oxy L = luciférine oxydée à l'état fondamental.

Dans trois espèces seulement le système luminescent a été étudié plus en détail, il s'agit de : (181) :

- bactérie lumineuse : *Photobacterium fischeri*
- arthropode : *Photinus pyralis* = luciole
- crustacé : *Cypridina higerdorfii*

Les luciférines de ces trois espèces sont très différentes. Il en serait de même des luciférase qui sont spécifiques d'une luciférine donnée. De plus chaque système nécessite des co-substrats différents.

MAC ELROY (115) a montré en 1947 que le système Luciférine-Luciférase (LL) de la Luciole, nécessite non seulement de l'eau et de l'oxygène pour fonctionner, mais aussi de l'ATP et du Magnésium : Le complexe LL et l'oxygène étant en excès, la bioluminescence émise aura une intensité proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans le milieu réactionnel. Cette découverte conduisit à la mise au point d'une méthode de dosage de l'ATP dans les milieux biologiques.

L'intérêt que présente ce dosage dans de nombreux domaines de la biochimie, incita de nombreuses équipes à préparer un réactif à partir des lucioles, à élucider les mécanismes de la réaction et à en évaluer les performances. (197).

Il est évident que la sensibilité de la mesure sera fonction aussi de la sensibilité du système de détection de la lumière émise.

L'évaluation visuelle et l'enregistrement photographique ont été avantageusement remplacés par les mesures électroniques de la lumière.

Parmi les transformateurs de l'énergie lumineuse en énergie électrique, les photomultiplicateurs inventés par l'américain SWORYKINE occupent une place de choix. Le dispositif comporte :

- une photocathode revêtue d'un métal alcalin ou alcalinoterreux comme le césium déposé sur un oxyde d'argent, ou bien un alliage cuivre-béryllium.
- un photomultiplicateur.

Les photoélectrons émis par l'absorption d'un photon seront accélérés dans un champ électrique de 100 Volts environ vers une anode appelée dynode - qui émet un nombre d'électrons supérieur au nombre de photoélectrons. Si le rendement "n" est supérieur à 1, à 1 photoélectron incident, correspondent "n" électrons secondaires : ceux-ci sont accélérés par une tension du même ordre que la première appliquée entre la première dynode et la deuxième dynode où se produit un nouvel effet amplificateur. Si l'appareil comporte k dynodes en cascade, l'effet multiplicateur sera : n^k .

Finalement les électrons sont recueillis sur l'anode où ils donnent naissance à une impulsion électrique dont la durée est de l'ordre de 10^{-8} secondes.

La charge électrique recueillie "q", est proportionnelle au nombre d'électrons, donc au nombre de photons lumineux qui ont frappé la photocathode, lui-même proportionnel au nombre de molécules d'ATP.

Un photon émis par le système luciférine-luciférase, dans les conditions habituelles a une énergie suffisante (longueur d'onde d'émission : 562 nm) pour être détecté par une photocathode au césium. Cette énergie se situe à environ $3,5 \times 10^{-19}$ J soit 2 électrons Volts.

L'amplification n'est pratiquement limitée que par le "bruit de fond" dû à des électrons erratiques qui sous tension provoquent un signal électrique sans qu'il y ait eu production de photoélectrons. Ce "bruit de fond" est diminué en abaissant la température qui a tendance à augmenter du fait de la collision des atomes. (certains dispositifs sont placés dans de la glace ou de l'azote liquide).

Le dispositif du Chem Glow (AMINCO) est semblable au dispositif représenté figure 2.

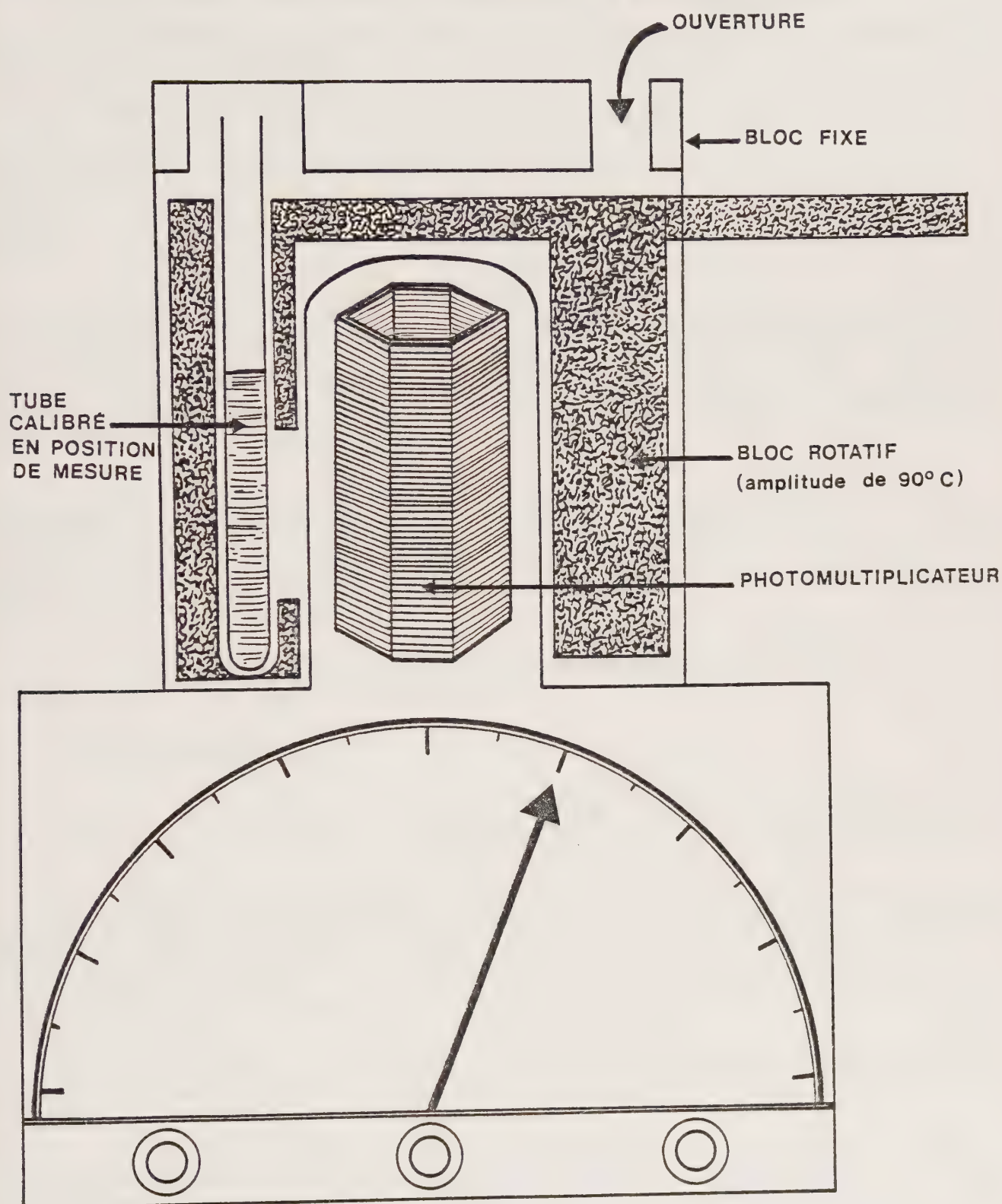
Les spectromètres à scintillation peuvent aussi être utilisés pour la mesure de la bioluminescence.

Le signal électrique "q" est faible et bref. Il ne peut être transporté directement, et doit passer par un pré-amplificateur qui est une capacité "C" dans laquelle la charge électrique "q" se traduira par une différence de potentiel "u" tel que $q = C \times u$.

— "u" est amplifié et enregistré sur un amperomètre gradué en unités arbitraires (unités lumières).

Les dispositifs de mesure de la bioluminescence existant sur le marché, sont nombreux. Leurs performances sont suffisamment bonnes et ne limitent pas la sensibilité de la mesure. Dans la plupart des cas en effet, les spectromètres à scintillation, ne donnent pas de meilleurs résultats qu'un simple spectromètre adapté aux mesures de bioluminescence, car la sensibilité est limitée par le bruit de fond de la réaction (99). Les réactifs utilisés, sont extraits, dans tous les cas, d'un milieu naturel qui apporte de très nombreux systèmes enzymatiques interférants responsables du bruit de fond.

FIGURE 2 - DISPOSITIF DE MESURE DE LA BIOLUMINESCENCE



II - 3. EXTRACTION DE LA LUCIFERASE (E.C. 2. 7. non défini).

Les composants du système de bioluminescence de la luciole, sont intra-cellulaires et se situent dans une zone bien définie de la paroi de l'abdomen de l'adulte.

Plusieurs méthodes d'extraction ont été décrites.

II - 3.1. Méthode de MAC ELROY et COULOMBRE (121).

Ces auteurs décrivent une technique d'extraction de la Luciférase et de la Luciférine.

Les organes séchés de lucioles sont broyés avec du sable et extraits avec de l'eau distillée. Le pH du mélange est ajusté à 8 avec de la soude, et après congélation et décongélation, la phase solide est éliminée par centrifugation. Le surnageant est épuisé par un gel de phosphate de calcium à pH 8. Après centrifugation le surnageant est traité par le phosphate de calcium à pH 8. Après centrifugation le surnageant est écarté et le gel qui contient la luciférase est conservé. Il est lavé et élué par une solution de sulfate d'ammonium à 7 %.

L'éluat est fractionné par addition de sulfate d'ammonium de concentration croissante. La plus grande partie de l'activité enzymatique se retrouve dans le précipité apparu entre 57 et 65 % de saturation de sulfate d'ammonium. Ce précipité est redissout dans l'eau et la solution obtenue est traitée par le phosphate de calcium, le gel est élué et l'éluat est précipité par le sulfate d'ammonium à 70 %. Le précipité repris par de l'eau

On reproduit sept fois le cycle d'opération. La préparation finale est exempte de luciférine et n'émet pas de lumière quand on ajoute de l'ATP.

II - 3.2. Méthode d'ANTONIK (2).

La technique décrite dans le brevet US N° 493.874 "Procédé de recherche et de dosage de l'enzyme créatine-phospho-kinase" que Alan ANTONIK a déposé le 2 Août 1974, est le suivant :

"On utilise 10 ± 2 g d'organes lumineux lyophilisés de lucioles (ils sont vendus dans le commerce) pour 1000 ml de réactif en stock et pour 3000 ml de solution de travail. Les dits organes lumineux sont réduits en fine poudre en utilisant un mortier et un pilon ou d'autres broyeurs. On peut utiliser aussi une "poudre à l'acétone" (cette poudre est préparée en lavant la poudre des organes lumineux des lucioles avec de l'acétone, puis en filtrant et en séchant).

On extrait ensuite la substance avec 1000 ml d'agent tamponnant constitué par de l'acide morpholino-propane-sulfonique 0,1 M (tampon MOPS) ajusté à un pH de 7,3 avec de la soude.

Les concentrations de tampon peuvent varier au moins entre 0,01 et 0,5 M et on peut utiliser une série d'autres tampons, par exemple l'hydroxyméthylaminométhane ou l'arséniate de potassium. L'eau elle-même peut être utilisée en ajustant son pH à 7,4 avec de la soude. On peut utiliser un agent chélatant comme l'acide éthylène-diamino-tetraacétique (EDTA) à une concentration de 0,001 M, mais cela n'est pas nécessaire.

La solution (poudre de luciole, tampon, eau et agent chélatant) est ensuite centrifugée à 10.000 "G" pendant 15 minutes. La vitesse et le temps peuvent varier et l'on peut aussi employer d'autres méthodes de séparation.

II - 3.3. Méthode de RHEE et GREIFNER (159).

En 1975, ces auteurs ont proposé la technique suivante :

50 mg d'organes lumineux de lucioles (SIGMA FLE 50) sont extraits avec 10 ml d'un tampon glycylglycine 30 mM contenant 40 mM de chlorure de magnésium, pH 7,4. La luciférine étant photosensible, cette extraction est conduite à l'obscurité et à + 4° C. Après trois heures d'agitation, le mélange est centrifugé à 15000G, 10 minutes à 4° C. Le surnageant jaune est conservé à 0° C et dilué au 1/10e avant son utilisation. Compte tenu du fait que 50 mg d'organes lumineux de lucioles "Sigma" contiennent 0,25 mM d'arsenate de potassium et 0,1 mM de sulfate de Magnésium, la solution finale a la composition suivante :

- tampon glycylglycine : 30 mM
- Mg++ 41 mM
- AsO₄⁻ 1,5 mM (cette concentration n'est pas inhibitrice de la luciférase à pH 7,4).

On ajoute au milieu réactionnel de la luciférine à la concentration de 0,27 mM.

II - 3.4. Propriétés physico-chimiques et contrôle de qualité de l'extrait brut. (117).

- *Spécificité :*

La luciférase oxyde la luciférine en présence d'ATP et de sel de magnésium.

Les sels de manganèse peuvent remplacer les sels de magnésium,

Le calcium (Ca++) inhibe l'oxydation,

Les nucléotides suivants : ADP, UTP, ITP, CTP, ne peuvent remplacer l'ATP (116).

- *Inhibiteurs :*

L'activité de l'enzyme n'est pas affectée par les ions Arseniate ou Cyanure ou par l'azide, mais elle est très fortement inhibée par les Pyrophosphates, diverses amines, le cuivre et le para-chloromercuribenzoate. Pour ce dernier, l'inhibition peut être levée par le glutathion (120).

Le benzimidazole, le benzotriazole et d'autres dérivés substitués, inhibent la réaction par compétition avec la luciférine.

- *Maximum d'intensité lumineuse :*

- . pH : 7,8
- . température : 23 - 25° C.

- *Conservation :*

- . stable : 4 mois à - 20° C
- . dénaturation par l'air
- . l'activité décroît par congélations et décongélations successives.

– *Contrôle de l'activité de l'extrait.*

En 1949, la bioluminescence était appréciée à l'oeil par addition de quantité variable d'ATP. Cette méthode visuelle permettait, avec un extrait d'activité normale, de détecter 10^{-5} M d'ATP.

En 1956, l'utilisation des cellules photoélectriques permit de quantifier la bioluminescence. Le protocole préconisé est le suivant (117) :

– Dans un tube placé devant la cellule photoélectrique (photo-fluorimètre FARRAND) reliée à un photomultiplicateur fournissant une amplification de 10^5 , les auteurs ajoutent :

- extrait à tester (0,3 mg/ml de protéine dosé selon la méthode de LOWRY) 0,1 ml
- MgSO₄ 0,01 M 1 ml
- ATP 0,002 M 1 ml
- Luciférine 20 µg/ml 1 ml
- tampon glycine 0,05 M pH 8,0 qsp 10 ml

Le flash initial est enregistré. Ainsi il a été possible de définir une unité d'enzyme comme étant la quantité qui donne une unité arbitraire lumineuse (mesurée sur le photofluorimètre FARRAND) dans les conditions décrites ci-dessus.

L'activité spécifique est exprimée en unités lumineuses produites par 1 mg de protéine dosé selon la méthode de LOWRY.

Ces préparations obtenues par extraction des organes lumineux de lucioles renferment de nombreux systèmes enzymatiques qui sont responsables de réactions parasites, souvent gênantes :

- pyrophosphate (E.C. 3. 6. 1. 1.)
- luciféryl-adénylate hydrolase (E.C. non défini)
- nucléoside-diphospho-kinase (E.C. 2. 7. 4. 6.)
- myokinase (E.C. 2. 7. 4. 3.)
- ATP-pyrophosphatase (E.C. 3. 6. 2. 8.)

La solution d'enzyme brute obtenue par Mac ELROY et COULOMBRE a été soumise par HERSCHELL et MITCHELL (83) à une migration électrophorétique dans un milieu de force ionique décroissante. L'apparition de cristaux, montre que la luciférase est une euglobuline qui peut donc être purifiée par dialyse contre une solution de force ionique basse.

II - 4. PREPARATION DE LUCIFERASE PURIFIEE.

II - 4.1. Méthode de GREEN et MAC ELROY (76).

Dès 1956 GREEN et Mac ELROY proposèrent une technique de purification par cristallisations successives de la solution brute dans du sulfate d'ammonium à 50 - 60 % qui est dialysée contre une solution de force ionique basse :

– EDTA	0,01 M
– NaCl	0,01 M
– Na ₂ HPO ₄	0,02 M
– pH	7,2 à 7,4

La luciférase qui est une euglobuline, cristallise. Les cristaux isolés par centrifugation à froid, sont redissous dans une solution de sulfate d'ammonium 0,4 M à pH 8 contenant de l'EDTA à la concentration de 0,001 M. Cette solution est à nouveau soumise à une dialyse.

Après 3 cristallisations, les activités de la pyrophosphatase inorganique et de la luciferyl adenylate hydrolase, ne sont pas retrouvées.

La solution obtenue est homogène à l'électrophorèse et à l'ultra-centrifugation.

II - 4.2. Méthode de NIELSEN et RASMUSSEN (143).

En 1968, ces auteurs ont proposé une technique de purification par filtration d'un extrait brut sur une colonne de sephadex G 100.

II - 4.3. Propriétés physico-chimiques et contrôle d'activité de l'extrait purifié. (120, 119).

** Etudes physico-chimiques réalisées sur la luciférase (EC. 2. 7. . .) :*

- Constante de sédimentation : S_{25} (0,15 M NaCl) = 3,6
- Masse moléculaire : 100.000 d
- Constante de Michaelis pour l'ATP : 5×10^{-5} M
- Activateurs : Arseniate et sulfate de Magnésium
- Inhibiteurs : p.mercuribenzoate, chlorométhylcétone de la N. tosyl-L-Phénylalanine.
- pH au point isoélectrique : 6,2 - 6,3
- Spécificité absolue pour l'ATP,
- pH optimum : 7,8

** Contrôle de l'activité de la Luciférase purifiée :*

Le protocole proposé par MAC ELROY (118) est le plus couramment utilisé :

– **Appareillage** : Les mesures sont dans tous les cas évaluées en Unités arbitraires qui dépendent de l'appareillage. Les auteurs utilisent couramment le fluorimètre TURNER, modèle 111,

ou le fluorimètre FARRAND, ou bien BECKMAN Modèle 7300 ou modèle DU, ou encore le spectrofluorimètre BOWMANN – AMINCO.

– *Mélange réactionnel :*

. tampon glycylglycine 0,025 M pH 7,9	2 ml
. sulfate de Magnésium 0,1 M	0,1 ml
. Luciférine à $6 \cdot 10^{-4}$ M	0,1 ml
. Luciférase	5 et 10 μ g

– *Protocole opératoire :*

- . La réaction est déclenchée par l'injection rapide de 0,2 ml d'une solution d'ATP 0,02 M (pH 7,4).
- . l'intensité lumineuse maximum qui apparaît "après quelques secondes" est retenue comme la mesure de la vitesse initiale de la réaction.

– *Expression des résultats :*

- . les résultats sont exprimés en unités arbitraires d'intensité lumineuse par milligramme de protéine mesurée par spectrophotométrie à 278 nm.

II - 4.4. Production de la D (-) Luciférine.

La Luciférine peut être obtenue soit par extraction à partir du milieu biologique, soit par synthèse.

– *Méthode d'extraction (15).*

Au cours de l'extraction de la luciférase, selon la méthode de MAC ELROY et COULOMBRE, les surnageants obtenus après épuisement par le gel de phosphate de calcium sont ajustés à pH 3,5 et extraits deux fois avec un volume égal d'acétate d'éthyl. Après évaporation à reflux, la luciférine est reprise dans un petit volume d'eau.

Cette préparation peut être purifiée par adsorption de la Luciférine sur une colonne "DOWEX" traitée à l'acide chlorhydrique et la luciférine est éluée par l'ammoniaque. Ce cycle d'opération est reproduit deux fois.

Ainsi BITLER et MAC ELROY (15) ont obtenu 9 mg de luciférine cristallisée à partir de 15.000 Lucioles.

La pureté de la luciférine a été contrôlée par le spectre d'absorption (330 - 263 nm à pH7), et le spectre d'émission (340 nm).

– *Structure de la D (-) Luciférine.*

BITLER (15) a montré que l'hydrolyse acide de la luciférine donne naissance à la D (-) cystéine et à de l'hydroxybenzothiazole.

L'analyse structurale a révélé que la cystéine est sous forme de Thiazoline fixée sur le carbone en position 2 de l'hydroxybenzothiazole (cf. schéma 5). (114).

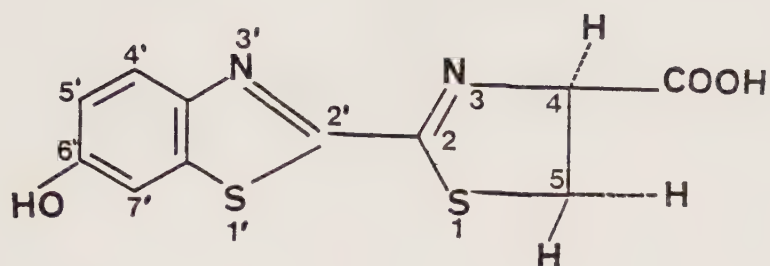
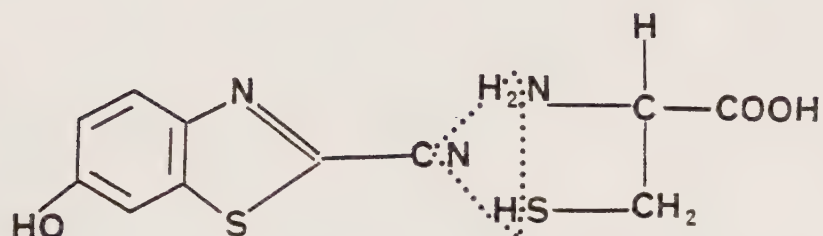
— *Synthèse de la D (-) Luciférine.*

Les schémas de synthèse proposés (183, 214), comportent toujours une étape terminale au cours de laquelle a lieu la condensation de la D (-) cystéine avec le 2 cyano-6-hydroxybenzothiazole (cf. schéma 5).

La luciférine est peu stable à la lumière et peut être facilement oxydée en déhydroluciférine (cf. schéma 6) qui peut aussi réagir avec la luciférase et l'ATP, mais sans produire de bioluminescence.

— Les préparations Luciférine-Luciférase du commerce (SIGMA, BOEHRINGER, WORTHINGTON, LUMAC, et ANTONIK), sont sous forme lyophilisée. Le milieu réactionnel reconstitué a un pH voisin de 7,4.

Dès que MAC ELROY eut à sa disposition des substances chimiquement pures (Luciférase cristallisable, luciférine et analogues structuraux de synthèse) il put aborder l'étude des mécanismes réactionnels de bioluminescence dont les principaux sont décrits dans le paragraphe suivant.

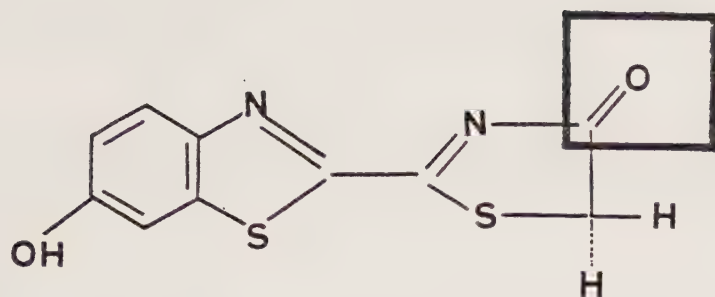
D(-) LUCIFÉRINE (LH₂)

6 HYDROXY - 2 CYANO - BENZOTHAZOLE

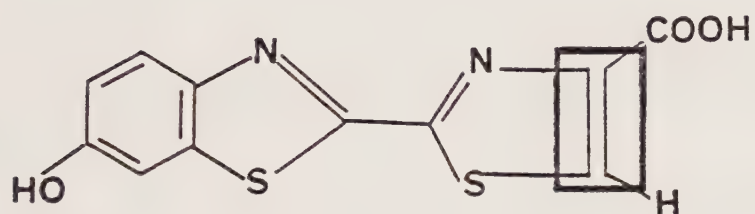
D (-) CYSTÉINE

SCHEMA N° 5

RÉACTION TERMINALE DE SYNTHÈSE DE LA D (-) LUCIFÉRINE



OXYLUCIFÈRINE (OXYL)



DÉHYDROLUCIFÈRINE (L)

SCHEMA 6

ANALOGUES STRUCTURAUX LES PLUS COURANTS DE LA D (-) LUCIFERINE

II - 5. MECANISME DE LA REACTION DE BIOLUMINESCENCE (39).

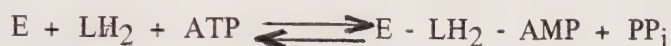
Comme l'a montré MAC ELROY (122), l'énergie nécessaire à la réaction de bioluminescence est apportée par les liaisons "phosphate" de l'ATP.

Tout d'abord nous envisagerons la réaction de bioluminescence sous son aspect chimique et cinétique. Puis nous aborderons la réaction produite avec le déshydroxyluciférine (L) et nous décrirons les différents facteurs influençant la nature de la lumière émise.

II - 5.1. Description de la réaction. (32).

La réaction se développe en trois étapes : (schéma 7).

— *Premier temps* : Activation de la luciférine sous la forme d'un adénylate de luciférine et libération de pyrophosphate.



— *Deuxième temps* : départ du radical carboxyle et libération de l'AMP sous l'action de l'oxygène moléculaire.



— *Troisième temps* : le carbone (C4) qui portait le groupement carboxyle, passe à un état excité et se désexcite en émettant un photon.



II - 5.2. Cinétique de la réaction de bioluminescence :

Le pic de bioluminescence apparaît quelques dixièmes de secondes après le mélange de la luciférase et de ses substrats. DE LUCA et MAC ELROY (40) en travaillant dans des conditions opératoires analogues à celles qui sont imposées par l'étude d'une cinétique rapide, ont montré que la courbe de bioluminescence à l'aspect suivant : (figure 3).

Après une phase de latence d'environ 25 millisecondes (msec), une phase de croissance atteint son maximum à la 250 msec. La phase de décroissance est d'allure exponentielle, et la bioluminescence se stabilise après deux secondes environs.

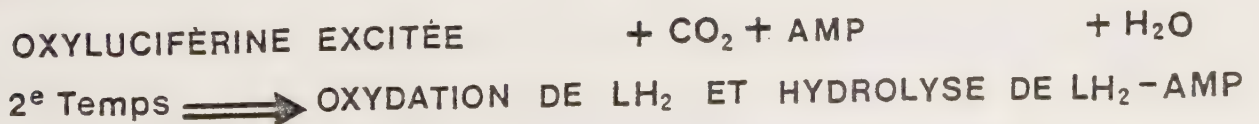
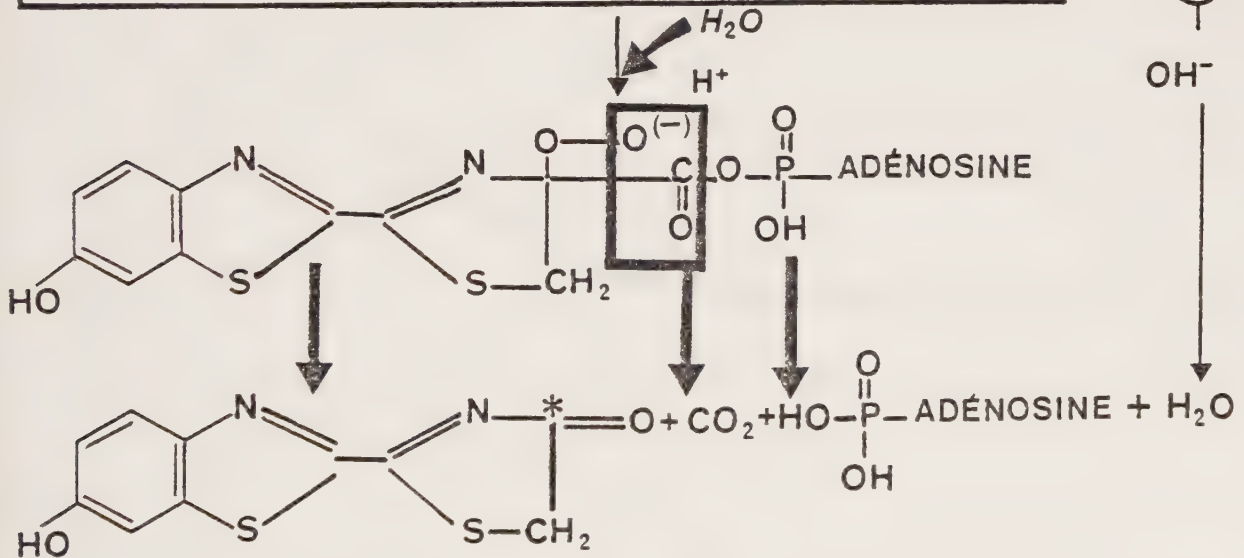
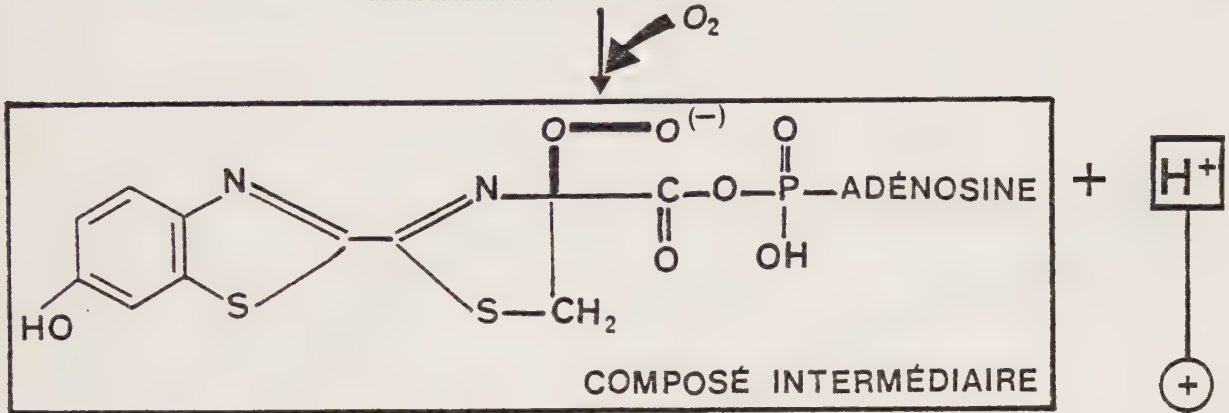
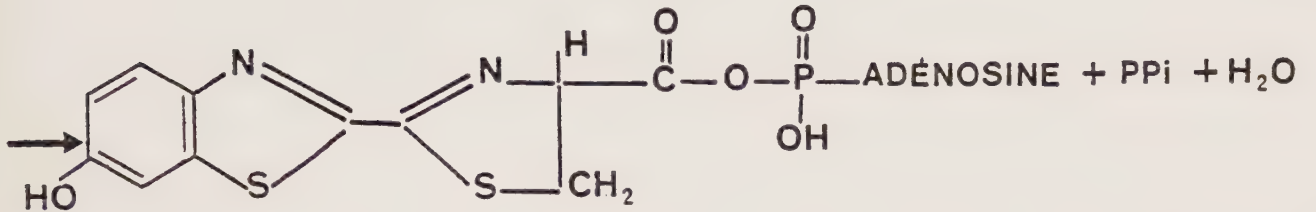
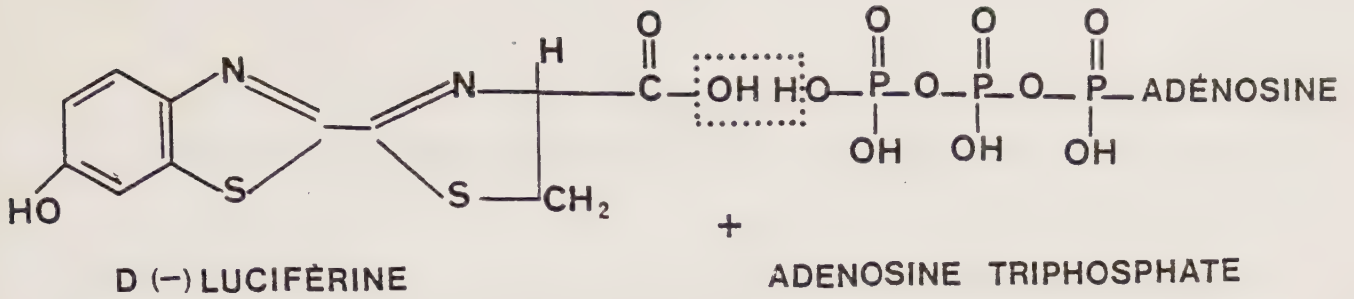
RHEE et GREIFNER (159), ont confirmé ces données qui peuvent se résumer ainsi :

— L'intensité lumineuse mesurée par la hauteur du pic, est directement proportionnelle à la quantité d'ATP consommée dans la réaction par unité de temps.

— La cinétique de la réaction de bioluminescence est d'ordre 1 pour 87 % au moins de la lumière émise. La constante de vitesse est : $2,3 \pm 0,2 \text{ sec}^{-1}$.

— Cette cinétique qui peut être assimilée à la vitesse initiale d'une réaction michaelienne, est indépendante de la concentration en ATP entre 0,5 μM et 0,1 mM. Ceci signifie que :

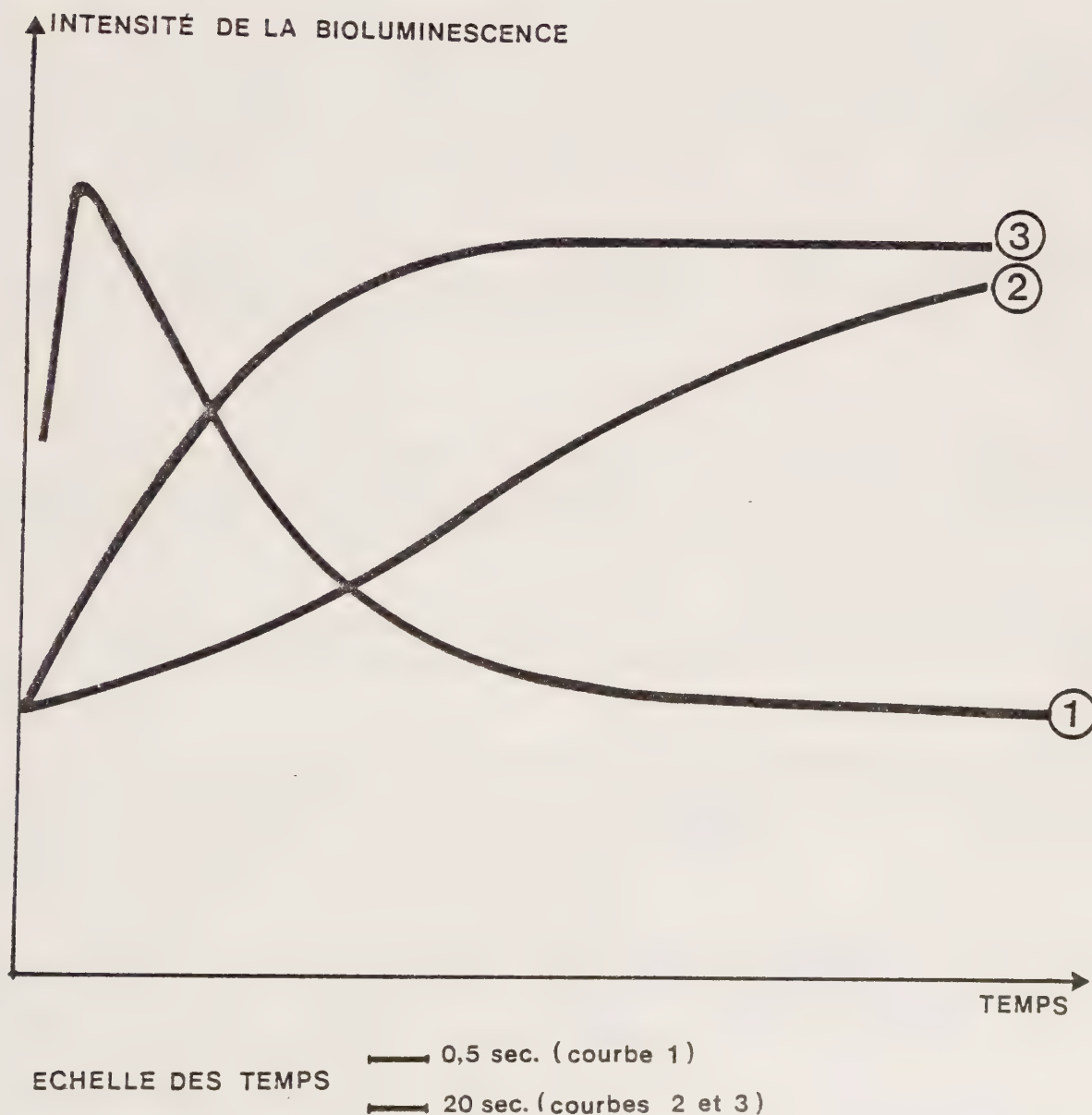
. l'oxygène à la concentration de 1 mM, n'est pas un facteur limitant de la réaction dont l'amplitude est proportionnelle à la quantité d'ATP.



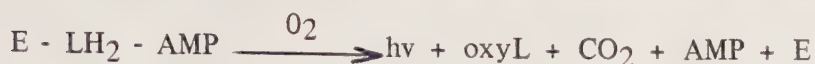
ÉTUDE DE LA RÉACTION ATP-LL

FIGURE 3
CINETIQUE DE LA BIOLUMINESCENCE (tiré de DE LUCA - MAC ELROY) (40)

Légende : courbes 1 et 2 : enregistrement de l'intensité de la bioluminescence produite par l'injection d'ATP dans la luciférine-luciférase en aérobiose.
courbe 3 : injection du mélange ATP - LL préparé en anaérobiose dans un tampon oxygéné.
(le temps de réponse de l'appareil est de 5 msce).



. l'étape limitante de la réaction est la décomposition du complexe uni-moléculaire :



— La luciférase n'intervient pas sur la cinétique de cette dernière réaction. En effet :

. l'excès de luciférase ne modifie en rien la vitesse de décomposition du complexe E - LH₂ - AMP.

. De même, le complexe LH₂ - AMP préparé par voie chimique, se décompose avec la même vitesse que le complexe "E - LH₂ - AMP".

On peut donc conclure que la cinétique de la réaction de bioluminescence est d'ordre 1 et déterminée par la cinétique de la réaction de décomposition du complexe "E - LH₂ - AMP".

— La luciférase intervient uniquement dans la formation du complexe "E - LH₂ - AMP".

En effet :

. Si la luciférase est préincubée en anaérobiose, avec de la luciférine et de l'ATP, de telle sorte que le complexe reste sous la forme "E - LH₂ - AMP", la réaction de bioluminescence peut être démarrée par un mélange rapide avec un tampon oxygéné. Dans ces cas, la phase de croissance est réduite de 200 msec à 60 msec, et la phase de latence est absente.

— Un changement conformationnel de la luciférase, accompagné du départ sous la forme de proton, de l'hydrogène fixé sur le carbone C₄ de la luciférine, serait responsable du temps de latence de 25 msec et du ralentissement de la vitesse initiale.

La séquence des réactions est représentée dans le schéma 8.

LEMASTERS et HACKENBROCK (109) ont confirmé que la hauteur du pic de bioluminescence dépend de la quantité d'ATP. En assimilant la hauteur du pic de bioluminescence à la vitesse de la réaction, la luciférase montre une cinétique michaelienne vis-à-vis de l'ATP, quand les substrats sont en excès.

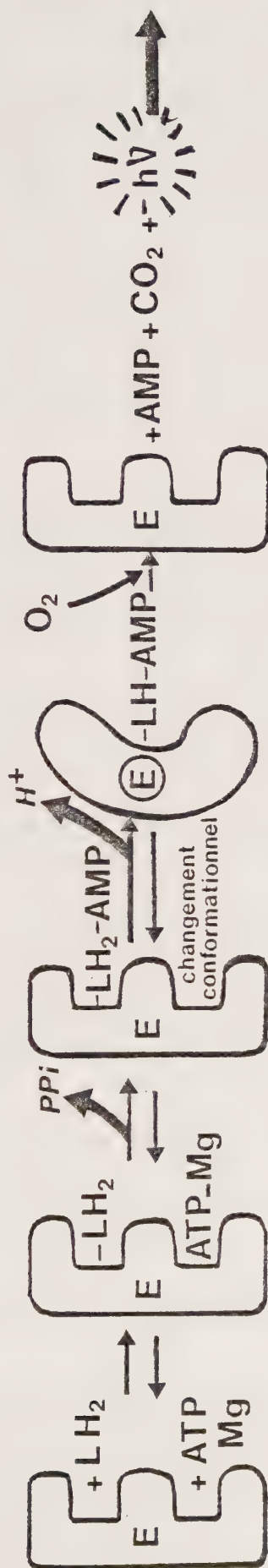
La rapide décroissance exponentielle qui suit le pic, n'est pas due à la consommation d'ATP mais, plutôt à l'inhibition spécifique de la luciférase par le produit d'oxydation de la luciférine : l'oxyluciférine.

. Ces auteurs utilisèrent des concentrations d'enzymes suffisamment basses pour que la réaction se déroule en concentration de substrat stationnaire. Ainsi, ils purent montrer que l'oxyluciférine est un inhibiteur compétitif de la luciférine et non compétitif de l'ATP - ce qui permet de mesurer, dans ces conditions, la production continue d'ATP.

Le niveau de base de la luminescence que l'on observe après le pic initial correspond donc à un équilibre entre le complexe inactif : "E - oxyL - AMP" et le complexe actif : "E - LH₂ - AMP". Ainsi, lorsque l'on ajoute au milieu réactionnel contenant le complexe "E - oxyL - AMP", de l'ATP, on observe à nouveau un pic de bioluminescence, proportionnel à la quantité d'ATP ajouté. (figure n° 4).

SCHEMA 8

CHANGEMENT CONFORMATIONNEL DE LA LUCIFERASE
 AU COURS DE LA REACTION ATP - LH (tiré de DE LUCA - MAC ELROY) (40)



Légende : L'étape comportant le départ de l'hydrogène sous la forme de protons et le changement conformationnel durerait 25 msce (temps de latence).

II - 5.3. Réaction produite avec la déhydroluciférine (L). (160).

La déhydroluciférine (L), produit d'oxydation de la luciférine (LH2) joue le même rôle d'inhibiteur compétitif vis-à-vis de la luciférine que l'oxyluciférine (oxyL). La déhydroluciférine est utilisée pour les études de cinétique, mais il est possible qu'elle joue un rôle en pratique courante, car elle peut se former spontanément à partir de la luciférine au cours de la préparation ou de la conservation des réactifs.

Lorsqu'on utilise comme substrat la déhydroluciférine, la réaction devient :



La différence fondamentale entre ces deux composés (L et LH2) réside dans la propriété suivante :

Alors que le complexe "E - LH2 - AMP" se décompose par oxydation en présence d'oxygène moléculaire pour donner naissance à de l'oxyluciférine, de l'AMP et du gaz carbonique, le complexe "E - L - AMP", reste stable en présence d'oxygène moléculaire.

II - 5.3.1. Etude de la cinétique de la réaction.

La réaction produite avec la déhydroluciférine peut être suivie par la mesure de la décroissance de la fluorescence (maximum d'excitation à 350 nm, maximum d'émission à 540 nm). En effet, la forme libre émet une fluorescence importante, mais le complexe L - AMP émet très faiblement.

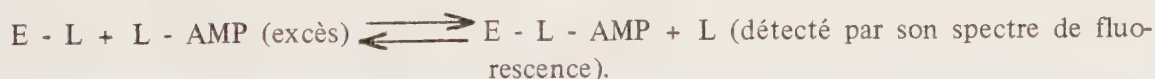
La réversibilité de la réaction a été démontrée en suivant l'incorporation du $^{32}PP_i$ à l'ATP en présence de luciférase et du complexe E - L - AMP.

II - 5.3.2. Devenir du complexe "E - L - AMP".

— RHODES et MAC ELROY en 1958 (160) ont montré que dans le mélange contenant "E - L - AMP" et un excès de "L - AMP", l'addition d'ATP provoque une augmentation de la fluorescence, donc une libération de la déhydroluciférine. Cette dernière ne peut provenir que de l'hydrolyse, en présence d'ATP, du complexe E - L - AMP en E - L d'une part, et AMP d'autre part.

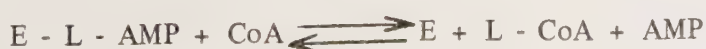


L'excès du complexe L - AMP prend alors la place de la déhydroluciférine sur les sites de l'enzyme.



A l'inverse, lorsque "L - AMP" est en défaut par rapport à la luciférase, la déhydroluciférine fixée sur la luciférase n'est pas déplacée et réagit avec les molécules d'ATP ajoutées.

— MAC CAPRA en 1968 (114), a mis en évidence une réaction entre "E - L - AMP" et le coenzyme A (CoA).

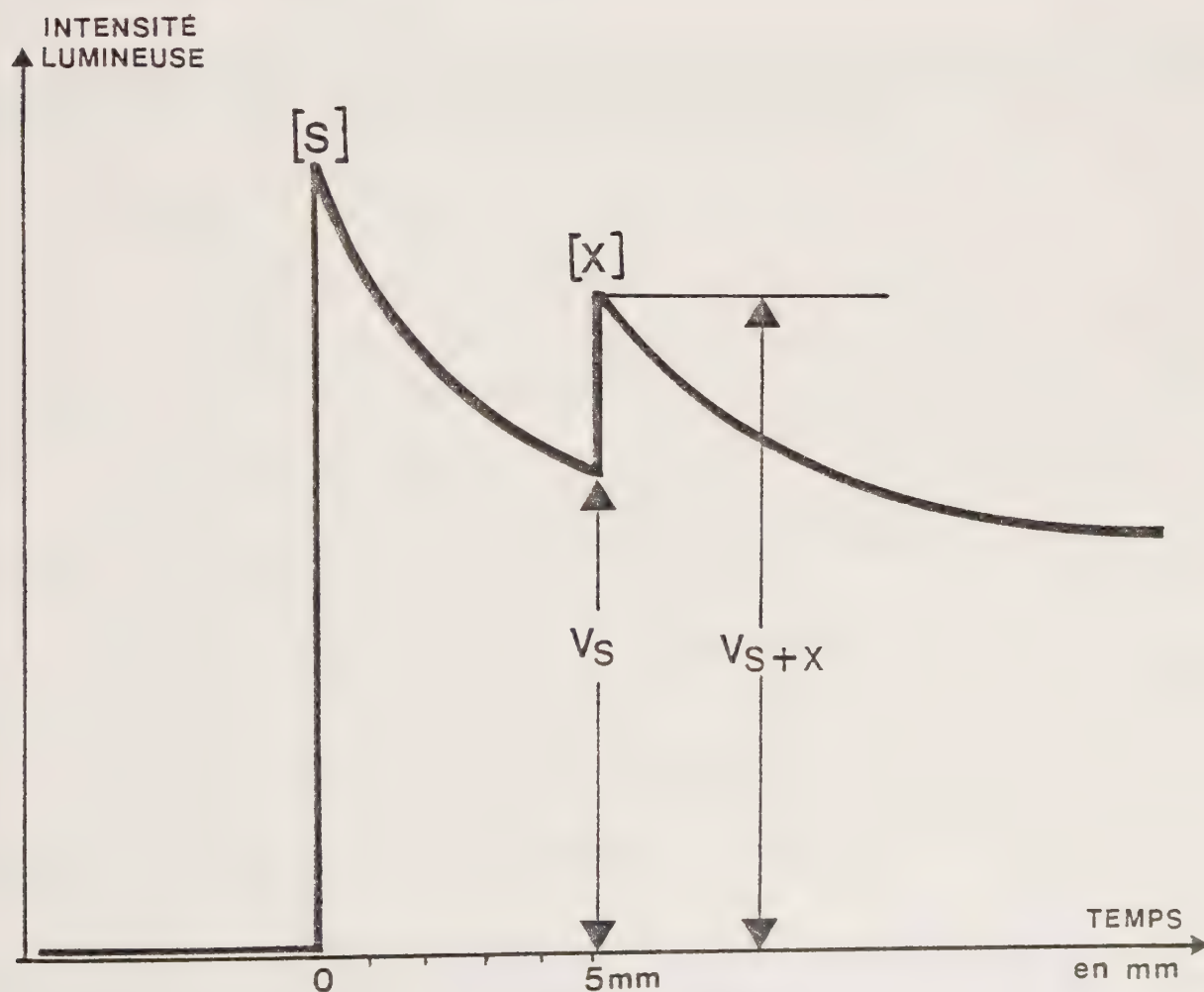


Légende : 239 micromoles d'ATP sont ajoutés en (S) et en (X). V_s et $V(s + x)$ sont les vitesses relatives de la réaction de luminescence juste avant et après l'addition (X). La décroissance rapide de l'intensité de la bioluminescence n'est pas due à la consommation d'ATP, mais à l'inhibition spécifique par l'oxyl - inhibiteur compétitif de LH2 et non compétitif de l'ATP.

FIGURE 4.

DÉCROISSANCE DE LA BIOLUMINESCENCE EN EXCES D'ATP

○ EFFET INHIBITEUR COMPÉTITIF DE L'OXYLUCIFÉRINE (tiré de LEMASTERS et HACKENBROCK) (109).



Ainsi, le coenzyme A peut libérer la luciférase de son complexe avec l'adénylate de déhydroLuciférine.

D'autres composés soufrés ont une action sur le composé "L - AMP" libre, mais cette action est très faible quand L - AMP est lié à la luciférase.

II - 5.3.3. Bilan de la réaction.

— La déhydroLuciférine est un inhibiteur compétitif potentiel de la luciférase vis-à-vis de la Luciférine. Dans ces conditions, son K_i mesuré par DENBURG et al. (49), est de 1×10^{-6} M.

— Si la luciférase est en présence d'un excès de L et d'ATP, l'équilibre (1) se déplacera vers la droite en présence de pyrophosphatase qui détruit le pyrophosphate. Ainsi en présence de pyrophosphatase, la réaction conduira à la formation de "E - L - AMP".

Si cette molécule est hydrolysée, soit en présence de coenzyme A, soit par la réaction décrite (cf. § II-5.3.2.), soit par une luciféryladénylate-hydrolase, la luciférase jouera un simple rôle d'ATPase (118) hydrolysant l'ATP en AMP et PP_i .

II - 5.4. Caractères de la bioluminescence (122).

La longueur d'onde à laquelle l'émission de bioluminescence est maximum se situe à 562 nm (pH 7,8). La transition électronique permise sur le groupement chromophore en C_4 de la Luciférine devrait à lui seul déterminer la fréquence du rayonnement émis.

Cependant, de nombreux facteurs interviennent :

** Influence de la nature de la luciférase.*

La même Luciférine utilisée comme substrat émet un pic de bioluminescence variant du vert à l'orange selon l'origine animale de la luciférase utilisée.

** Influence du pH : (39)*

Les variations de pH entraînent des modifications de la liaison de l'enzyme et de son substrat (L ou LH2) - qui se répercuteront :

- . sur la longueur d'onde de la bioluminescence produite,
- . sur la nature du spectre de fluorescence de la Luciférine ou de la déhydroLuciférine.

a) Influence du pH sur la longueur d'onde de la bioluminescence produite.

La fréquence de l'émission lumineuse passe de 562 nm à 617 nm selon que le pH est supérieur ou inférieur à 6,8.

Dans le même système, en remplaçant le groupement phénolique porté par le carbone 6' de la Luciférine par une fonction amine, l'émission se déplacera à 617 nm quelque soit le pH.

Ainsi l'émission dans le rouge (617 nm) est due à un retour à un état fondamental d'une molécule monoanionique excitée. Cette forme monoanionique apparaît avec la oxyluciférine quand le pH est inférieur à 6,8 et avec la 6' aminoluciférine quelque soit le pH.

L'émission dans le jaune-vert (562 nm) est due au retour à l'état fondamental de la forme dianionique excitée. Cette forme n'existe qu'avec l'oxyluciférine pour un pH supérieur à 6,8 (cf. schéma 9).

Pour expliquer ce phénomène, les auteurs évoquent une interaction possible entre le groupement phénolate en 6' de l'oxyluciférine et un résidu "histidine" de la luciférase. Lorsque le pH du milieu réactionnel se rapproche du pK de l'histidine (6,1), celle-ci apparaît sous forme ionisée, et stabilise l'ion phénolate du carbone 6' de l'oxyluciférine (cf. schéma 10).

b) Influence du pH sur le spectre de fluorescence du substrat.

– Déhydroluciférine.

En l'absence de luciférase, à pH 7,8, le spectre d'excitation de la déhydroluciférine montre un pic à 350 nm avec un épaulement à 390 nm. Lorsque le pH du milieu réactionnel passe à pH 9, le maximum d'excitation apparaît à 390 nm. Le pK du groupement phénolique étant à 8,7 on peut admettre que la forme ionisée est excitée à 390 nm et que la forme non ionisée est excitée à 350 nm.

En présence d'un excès de luciférase, le pic d'excitation se situe à 350 nm quel que soit le pH. On peut donc admettre, que la déhydroluciférine n'est pas sous forme ionisée quand elle est située dans le site actif de la luciférase.

D'autre part, le spectre d'émission de la forme ionisée montre un pic à 540 nm avec un épaulement à 440 nm. Le spectre d'émission de la forme non ionisée montre deux pics égaux à 540 et 440 nm.

– Luciférine :

Le spectre de fluorescence de la luciférine au cours de la réaction de bioluminescence évolue :

. 3 secondes après le pic de bioluminescence, le pic d'excitation se situe à 350 nm et le spectre d'émission montre un pic à 440 nm : la forme phénolique non ionisée est donc prédominante.

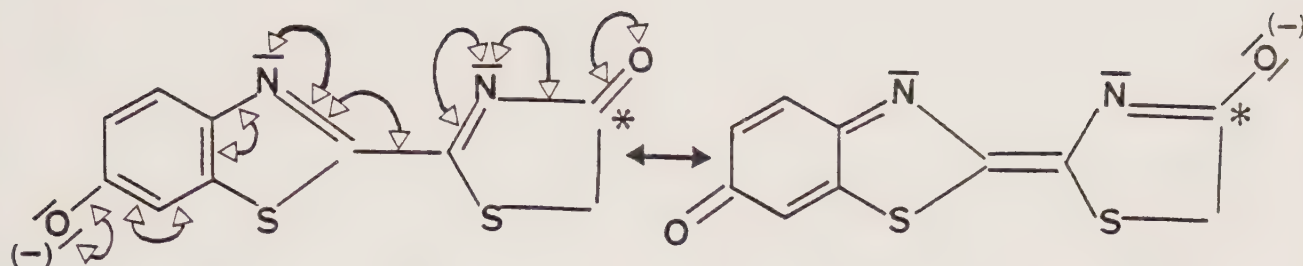
. 11 secondes après le pic de bioluminescence, l'excitation se situe à 350 nm et l'émission apparaît à 440 et 540 nm traduisant l'apparition de la forme ionisée.

– Influence des nucléotides : (122)

La remarquable spécificité de la réaction vis-à-vis de l'ATP est la base de nombreux essais utilisant cette réaction pour doser l'ATP.

Les autres nucléotides triphosphates sont inactifs et ont une activité faiblement inhibitrice. Ils interviennent surtout en se transformant en ATP grâce à des transphosphorylases qui sont présentes dans l'extrait brut de luciole.

L'isomère de l'ATP obtenu par la fixation du ribose en position 3 du noyau adénine (pseudo-ATP), donne une émission dans le rouge à pH 7,0 (à ce pH l'émission de l'ATP naturel se situe dans le jaune-vert). Donc à pH 7,0, la luciférine est sous forme monoanionique dans le complexe "L - Pseudo AMP". La forme dianionique n'apparaît qu'à pH 8 (avec l'ATP naturelle, cette forme apparaît à pH 6,8).



OXYLUCIFÉRINE .

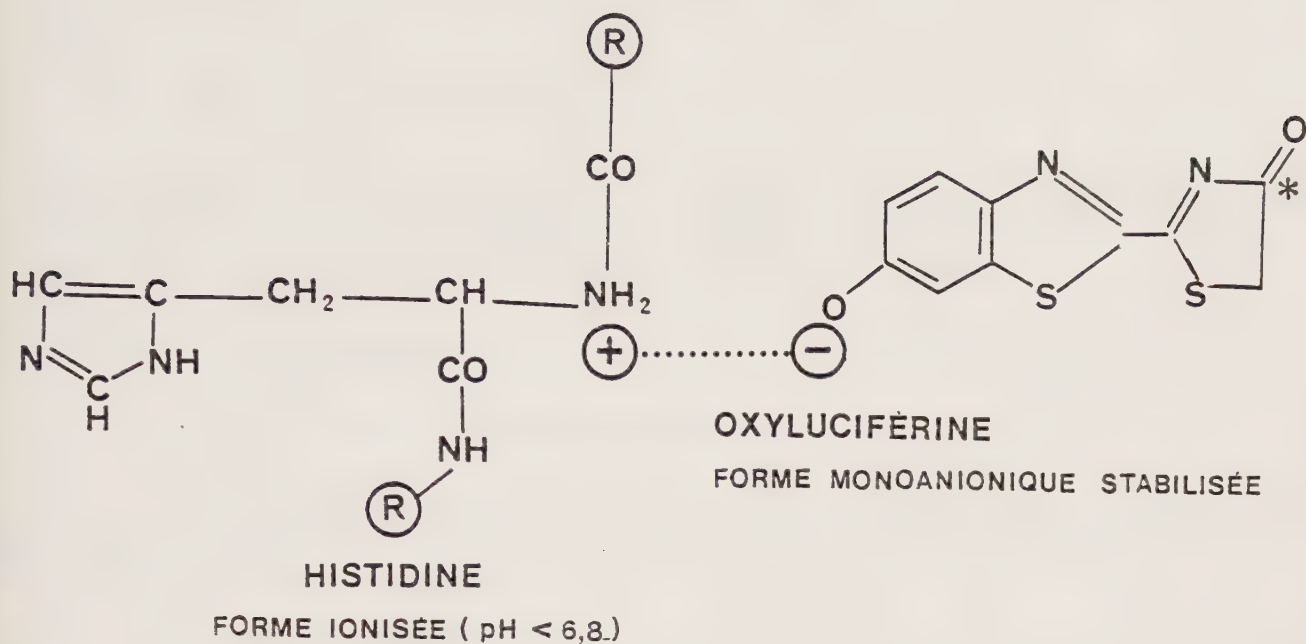
FORME DIANIONIQUE ÉNOLISÉE

pH > 6,8 ÉMISSION A 562 nm

SCHEMA 9

OXYLUCIFERINE : FORME DIANIONIQUE ENOLISEE

Légende : L'émission dans le jaune-vert (562 nm) est due au retour à l'état fondamental de la forme dianionique excitée qui n'apparaît qu'avec la luciférine pour un pH supérieur à 6,8.



SCHEMA 10

OXYLUCIFÉRINE : FORME MONOANIONIQUE STABILISÉE PAR
LA FORME IONISÉE DE L'HISTIDINE (pH inférieur à 6,8)

Légende : Interaction entre le groupement phenolate en 6' de l'oxyluciférine et un résidu "histidine" du polypeptide appartenant au site de fixation de la luciférine, La charge positive de l'azote aminé de l'histidine stabilise l'ion phénolate et l'émission se déplace à 617 nm.

Ces données supposent que la liaison entre l'ATP et la luciférine a un effet déterminant sur la couleur de la lumière émise. Le groupement aminé en 6 de l'adénine est fondamental dans la reconnaissance du site "substrat" de la luciférase. En effet l'inosine triphosphate (ITP) est complètement inactif.

– Influence des Ions métalliques (39) :

Lorsque l'ion Mg^{++} est remplacé par les ions Zn^{++} , Co^{++} , Mn^{++} , l'émission a lieu dans le rouge à pH 7,6. Ainsi pour des concentrations de chlorure de zinc passant de $1,3 \cdot 10^{-4}$ M, à $2,3 \cdot 10^{-3}$ M, la longueur d'onde maximum évolue de 562 nm à 617 nm.

II - 5.5. Structure de la Luciférase (76).

II - 5.5.1. Présence d'hydrogènes échangeables.

DE LUCA (39), a montré que la luciférase native, possède un nombre d'atomes d'hydrogène-échangeable par molécule assez important. Ce nombre se trouve abaissé quand la luciférase est liée à la déhydroluciférine et à l'ATP.

La présence de l'ATP-Mg seule ou de la déhydroluciférine seule, ne modifie pas le pool d'hydrogènes échangeables. La luciférase change donc sa structure conformationnelle quand elle se lie aux deux substrats. Ce changement consisterait en la formation d'une poche hydrophobe autour de la déhydroluciférine et de l'ATP qui serait en outre, responsable de la très forte liaison entre l'enzyme et ces substrats.

Les groupements thiols interviennent dans la formation de cette poche hydrophobe : en effet, le DTNB (5 - 5' - dithio - bis - 2 nitrobenzoïque acide) en bloquant les groupements thiols, rend l'enzyme inactive d'une part, et d'autre part la présence des substrats empêche la réaction des groupements thiols avec le DTNB.

II - 5.5.2. Spectre de dispersion rotatoire.

Les mêmes auteurs (122) ont montré que dans l'enzyme native, le pourcentage d'hélicoidalité est de 37 à 40 % et passe à 14 - 28 % dans le complexe : "E - L - AMP".

II - 5.5.3. Etude de l'énergie libre.

La variation d'enthalpie est augmentée en présence de substrat (49). Donc les substrats protègent l'enzyme de l'inactivation thermique.

II - 5.5.4. Masse moléculaire et structure quaternaire (76).

– GREEN et MAC ELROY montrèrent que la luciférase cristallisée sédimente à 3,5 S ce qui correspond à une masse moléculaire d'environ 100.000 d.

. Après traitement par la guanidine 5 M, la molécule se transforme en deux sous-unités de masse moléculaire voisine de 50.000. Il apparaît donc que l'enzyme native est un dimère.

Cette conclusion est confirmée par les résultats suivants :

Après alkylation, l'enzyme native est soumise à une digestion trypsique et au "finger-print".

L'analyse des acides aminés de la profine suggère que 87 à 90 peptides auraient du être obtenus si la luciférase avait été composée d'une seule chaîne poly-peptidique.

Or le nombre de peptides réactifs à la ninhydrine a été de 42 à 45 - donc la moitié de ce qui était prévu si on admet la monomérie de la protéine. Ces résultats confirment la dimérisation de la molécule. Les monomères sont semblables et DENBURG et al. (49) ont montré que le monomère (masse moléculaire : 50.000) est plus actif que le dimère (masse moléculaire : 100.000).

Ainsi chaque monomère peut fixer une molécule d'ATP et une molécule de luciférine - cependant, les résultats de l'équilibre de dialyse obtenus par DENBURG et al. (49) permettent de penser que, dans la molécule native, une seule molécule d'ATP et une seule molécule de Luciférine se fixent sur l'un des deux monomères, en inactivant le deuxième monomère.

II - 5.5.5. Etude de la solubilité (79)

Dans les solvants de force ionique relativement faible, les molécules de luciférase s'agrègent rapidement et réversiblement. Ainsi dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 7,8, on observe par ultracentrifugation l'apparition d'agréats dès que la concentration en protéine dépasse 2 mg/ml. Alors que dans une solution de sulfate d'ammonium à 10 % on n'observe pas d'aggrégation.

Dans un tampon phosphate 0,01 M les molécules de luciférase s'agrègent dès que la concentration en protéine atteint 0,2 mg/ml - cependant l'activité enzymatique spécifique n'est pas altérée par cette aggrégation et reste constante dans une limite de 0,04 à 0,6 mg/ml de protéine.

Cette agrégabilité s'explique par la très forte proportion de squelettes d'acides aminés, non polaires à l'extérieur de la molécule qui la rendent hydrophobe.

Le milieu réactionnel utilisé dans la réaction de screening possède une molarité voisine de 0,07 M et la concentration en protéine est de l'ordre de 0,35 mg/ml. L'activité enzymatique spécifique ne doit donc pas être altérée par l'aggrégation.

II - 5.6. Conclusions :

Le noyau benzothiazole est placé à l'intérieur du site de fixation de la luciférine sur la luciférase - la fonction phénol étant tournée à l'intérieur du site. Le groupement carboxyle porté par le noyau thiazolique est tourné vers l'extérieur du site ce qui facilite sa réaction avec l'AMP produit par l'hydrolyse de l'ATP qui est dans un site proche.

La position de la luciférine dans son site de fixation a été confirmée par les études thermodynamiques réalisées en remplaçant la luciférine par des analogues structuraux (49).

Ce site de fixation a, comme nous l'avons vu, une grande influence sur la nature de la bioluminescence émise.

Enfin, l'oxyluciférine formée joue le rôle d'inhibiteur compétitif vis-à-vis de la luciférine, uniquement dans des conditions de saturation en substrat.

Les conditions opératoires (pH, force ionique, substrat, ions métalliques.....) de la réaction de screening, sont donc bien adaptées au maintien de l'environnement réactionnel nécessaire au bon déroulement des mécanismes de production de la bioluminescence.

La réaction "ATP-LL", dans les conditions du screening, se développera dans les conditions quasi optimum mais de nombreux autres complexes enzymatiques contenus dans la luciférase brut interfèreront sur la production d'ATP par la créatine kinase ou sur l'utilisation de l'ATP dans la réaction de bioluminescence. Nous envisagerons plus particulièrement l'influence de la pyrophosphatase (E.C. 3. 6. 1. 1.) et de la myokinase ou adénylate kinase (AK) (E.C. 2. 7. 4. 3.).

○

II - 6. ROLE DE LA PYROPHOSPHATASE (EC. 3. 6. 1. 1.) DANS L'EXTRAIT BRUT DE LUCIFERINE-LUCIFERASE.

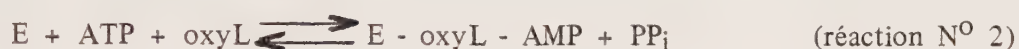
II - 6.1. Rappels Bibliographiques (116, 124).

La réaction classique de bioluminescence observée en utilisant comme source de luciférase un **extrait brut** de luciole, se traduit par un pic de bioluminescence suivi d'une décroissance très rapide jusqu'à un niveau stable (figure n° 5).

Or si on emploie une même activité théorique de luciférase **purifiée** dans les mêmes conditions expérimentales, on n'observe pas de décroissance (figure n° 5).

De plus on constate qu'une quantité sensible d'ATP est soustraite à la réaction de bioluminescence. Ce phénomène a été expliqué par la présence d'une pyrophosphatase dans l'extrait brut et MAC ELROY en a expliqué les mécanismes (124).

En 1956, cet auteur a montré que la pyrophosphatase déplace vers la droite les deux réactions :



Alors que la réaction N° 1 produit de la bioluminescence, la réaction N° 2 conduit, après décomposition du complexe "E - oxyL - AMP" à une hydrolyse non spécifique de l'ATP (cf. § II.5.3.3.).

Ainsi, le pyrophosphate introduit **après** l'ATP, donc après la formation du complexe "E - LH₂ - AMP" provoque une augmentation du pic de luminescence en inhibant la réaction N° 2.

Par contre, le pyrophosphate introduit **avant** l'ATP, déplace l'équilibre et diminue la formation du complexe "E - LH₂ - AMP" donc diminue le pic de bioluminescence.

Ainsi, en présence de pyrophosphatase, les réactions 1 et 2 sont théoriquement accélérées :

- la réaction N° 1, produit de la bioluminescence,
- la réaction N° 2, hydrolyse l'ATP, le détournant de la réaction N° 1.

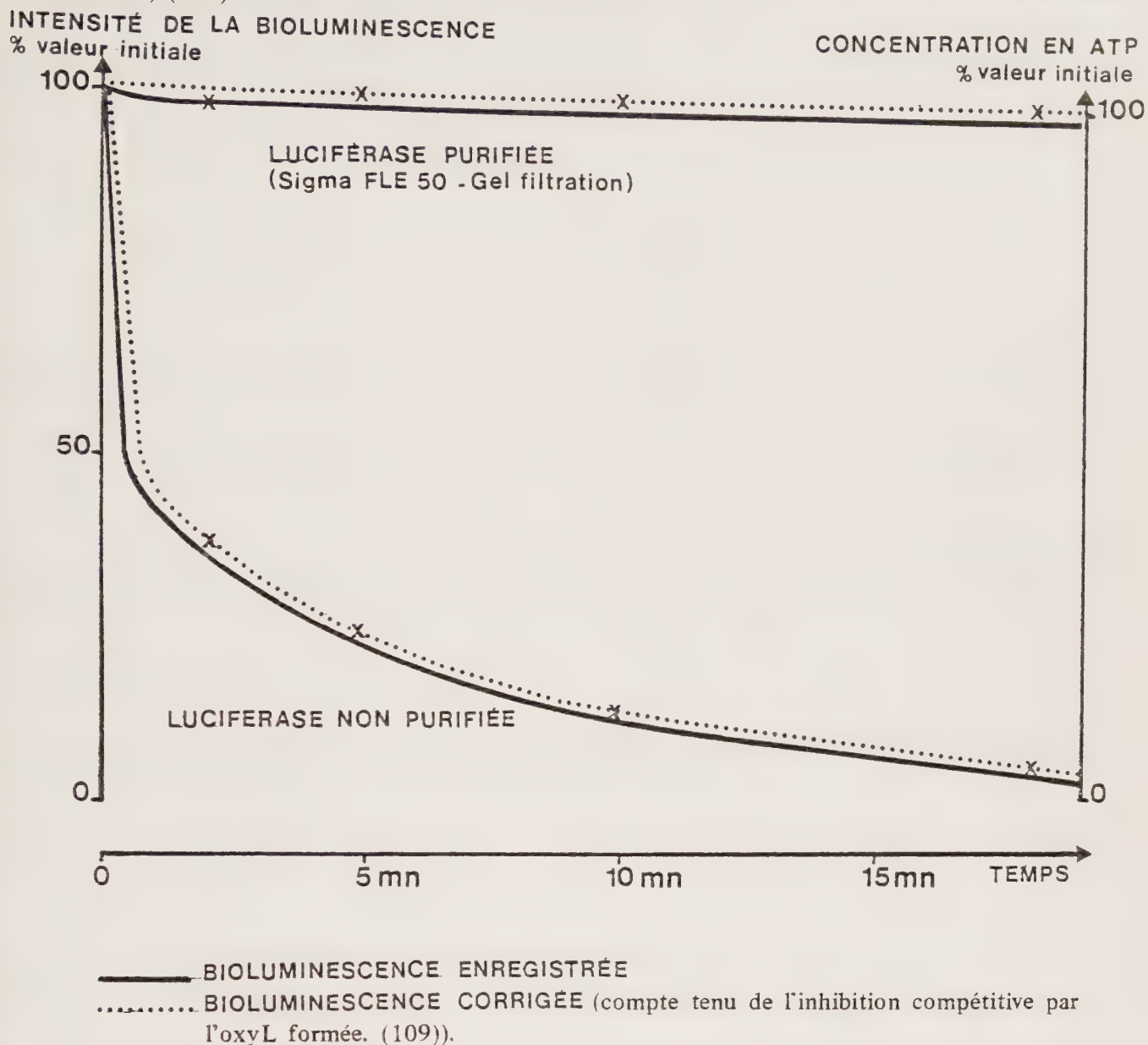
En utilisant de la luciférase purifiée, les réactions N° 1 et N° 2 seront ralenties par le pyrophosphate produit, mais la cinétique d'oxydation du complexe "E - LH₂ - AMP" étant plus rapide que la cinétique d'hydrolyse du complexe "E - oxyL - AMP", le déroulement de la réaction N° 1 de bioluminescence, est malgré tout favorisé.

Le même résultat peut être obtenu en ajoutant à de la luciférase non purifiée un inhibiteur de la pyrophosphatase (Mn⁺⁺, Co⁺⁺, F⁻) ou un triphosphate inorganique.

En utilisant de plus fortes concentrations d'ATP (10⁻⁵M) MAC ELROY et al. (124) ont observé avec de la luciférase non purifiée une décroissance très rapide de la bioluminescence, suivie d'une bioluminescence résiduelle qui persiste une dizaine de minutes après le début de la réaction. Le niveau de base de cette bioluminescence résiduelle est atteint en une minute et son amplitude dépend de la quantité d'ATP présente au départ. (Cette constatation a permis à BEUTLER et BALUDA (14) de proposer en 1964 une méthode de dosage de l'ATP dans les milieux biologiques).

FIGURE 5.

DÉCROISSANCE DE LA BIOLUMINESCENCE - LL EN EXCÈS. (tiré de LUNDIN et THORE) (111).



MAC ELROY et HASTINGS ont avancé comme hypothèse la formation d'un complexe "inactif" renfermant le complexe intermédiaire "E - LH2 - ATP". Ce complexe inactif libère le complexe "E - LH2 - ATP" au fur et à mesure que celui-ci se dégrade par oxydation.

Le schéma serait alors le suivant :
(schéma 11)

Selon MAC ELROY et al. (124), le complexe inactif aurait la nature suivante :



L'addition de pyrophosphate au milieu réactionnel renfermant le complexe inactif se traduit par l'apparition de deux pics de bioluminescence : (figure 6)

— le premier pic serait dû au déplacement par le pyrophosphate de l'ATP contenu dans le complexe inactif - l'ATP ainsi libéré provoque le pic de bioluminescence "A".

— le pyrophosphate qui a pris la place de l'ATP serait dans un deuxième temps hydrolysé par la pyrophosphatase provoquant la destruction du complexe inactif et la libération de luciférase qui est à nouveau disponible et provoque l'apparition du deuxième pic "B".

II - 6.2. Travaux personnels.

Dans les conditions opératoires de la première étape de la technique proposée, la quantité d'ATP apportée par l'échantillon de 4 μl . de sang est d'environ de :

$$\frac{500 \mu\text{M} / 1 \times 4}{10^{-6}} = 2 \text{ nM}$$

Cette quantité d'ATP diluée dans un volume réactionnel de 200 μl itres donne une concentration de l'ordre de 10 $\mu\text{M/l}$.

Bien que dans les conditions du screening, l'élution des taches de sang soit très progressive, il nous a semblé intéressant d'évaluer l'influence de la pyrophosphatase sur la dégradation de l'ATP apportée par un hémolysat.

Dans un premier temps nous avons montré que la bioluminescence décroît très rapidement.

Dans un deuxième temps nous avons montré que cette décroissance n'est pas due à une inhibition de la luciférase par l'oxyluciférine formée. Le mécanisme fait appel à la pyrophosphatase.

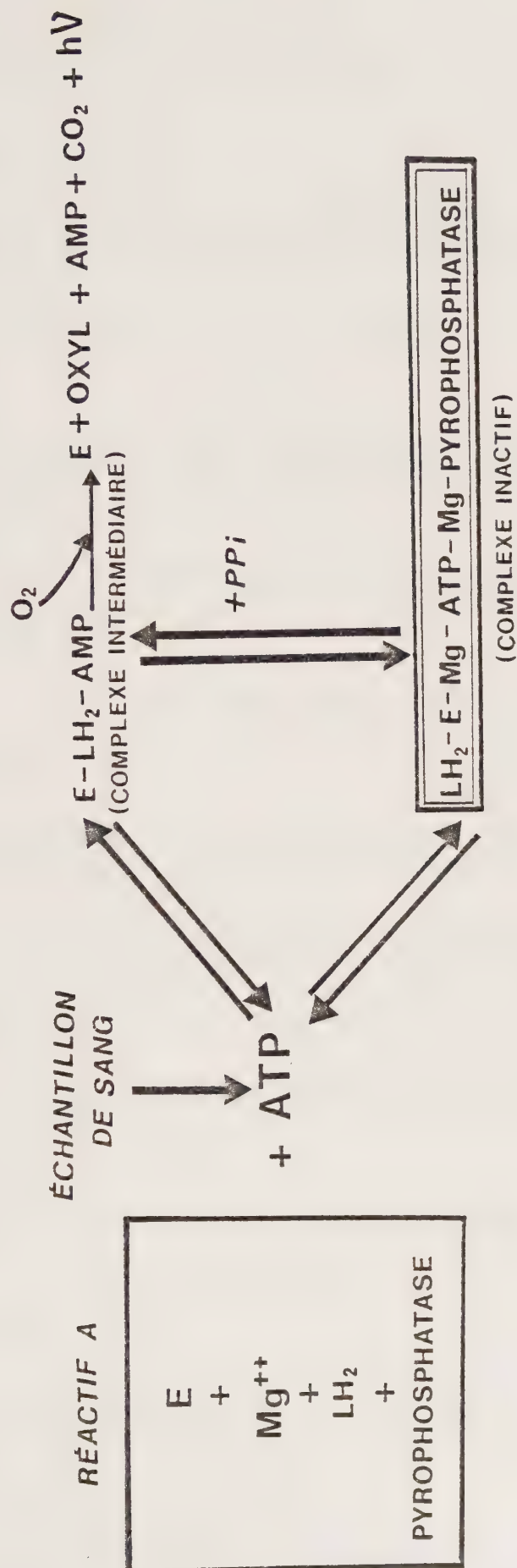
Enfin, nous avons tenté de mettre en évidence la formation du complexe inactif décrit par MAC ELROY et HASTINGS, puis nous avons montré que l'existence de ce dernier est limitée.

II - 6.2.1. Mise en évidence de la destruction de l'ATP apportée par l'échantillon :

— Protocole :

A 4 μl de sang total hémolysé, on ajoute 200 μl de réactif A. La bioluminescence est immédiatement enregistrée.

ROLE DU COMPLEXE INACTIF ET DU PYROPHOSPHATE
DANS LA REACTION ATP - LL QUAND LA LUCIFERASE N'EST PAS PURIFIEE



Légende : l'ATP apportée par l'échantillon est en partie "masquée" dans un complexe inactif en équilibre avec le complexe intermédiaire "E - LH₂ - AMP". Ce complexe inactif est dissocié par le pyrophosphate.

Le même protocole est appliqué en remplaçant les 4 μl de sang hémolysé par 4 μl d'une solution d'ATP à 500 $\mu\text{M/l}$.

– *Résultats* (figure n° 7).

La bioluminescence atteint un pic extrêmement rapidement. (l'enregistrement ne peut commencer que dans la phase de décroissance). L'allure des courbes est la même, pour les échantillons de sang et la solution d'ATP.

On peut admettre que le pic de bioluminescence est provoqué par l'ATP des globules rouges.

La décroissance très rapide de la bioluminescence peut être expliquée soit par la formation d'oxyluciférine qui joue le rôle d'inhibiteur compétitif de la luciférine (§ II.5.2.) soit par l'intervention de la pyrophosphatase. (§ II.6.1.).

II - 6.2.2. Mise en évidence du rôle de la pyrophosphatase.

– *Protocole :*

A 200 μl de réactif A on ajoute toutes les minutes 4 μl d'une solution d'ATP à 500 $\mu\text{M/l}$.

– *Résultats :*

A chaque addition, on obtient un pic de bioluminescence - donc la luciférase reste active et l'oxyluciférine formée n'est pas responsable de la décroissance rapide de la bioluminescence.

De plus, après chaque addition d'ATP, le niveau de base de la bioluminescence résiduelle est chaque fois plus élevé. Comme l'ont montré MAC ELROY et HASTINGS, le niveau de la bioluminescence résiduelle est fonction de la quantité de complexe inactif formé - qui lui même dépend de la quantité d'ATP ajouté. C'est effectivement ce que nous observons.

II - 6.2.3. Mise en évidence de l'existence du complexe inactif.

– *Protocole.*

A 200 μl de réactif A on ajoute toutes les 15 secondes 4 μl de la solution d'ATP à 500 $\mu\text{M/l}$.

– *Résultats.*

Après chaque addition, le niveau de base de bioluminescence s'élève alors que le niveau maximum des pics produits ne change pas. A la 6 ou 8e addition, l'amplitude devient négligeable.

– *Interprétations.*

La dégradation du complexe intermédiaire "E - LH2 - AMP" est responsable de la bioluminescence. En présence de fortes concentrations d'ATP, la luciférase est saturée et une nouvelle addition d'ATP ne provoque plus de pic de bioluminescence. Par contre, la concentration en complexe inactif augmente, et le niveau de la bioluminescence résiduelle s'élève.

Lorsque les additions d'ATP se succèdent toutes les minutes, à la 10^e addition de 4 μ l de la solution d'ATP à 500 μ M/l, on obtient toujours un pic - donc la luciférase a été régénérée par la destruction du complexe inactif.

La bioluminescence résiduelle est proportionnelle à la quantité d'ATP ajoutée. En effet, pour une même activité de la luciférase et de la pyrophosphatase, la quantité du complexe inactif formée dépend de la quantité d'ATP présente dans le milieu réactionnel (dans les limites de la saturation de la luciférase). Nous avons vérifié que la bioluminescence résiduelle de une heure est proportionnelle à la quantité d'ATP de départ. Les moyennes des 30 mesures de bioluminescence réalisées une heure après le mélange de 200 μ l de réactif A et de 4 μ l de la solution d'ATP à 500 μ M/l sont :

TABLEAU N° 4

Concentration de départ de l'ATP dans le milieu réactionnel (μ M)	Bioluminescence observée 60 minutes après l'addition d'ATP (UL).
10	45
20	95
30	120
40	150

Ces résultats confirment l'existence du complexe inactif et son rôle dans la production de la bioluminescence résiduelle.

II - 6.2.4. Rôle du pyrophosphate dans la décomposition du complexe inactif.

— Protocole.

A 200 μ l de réactif A, on ajoute 20 μ l d'une solution d'ATP à 500 μ M. 12 minutes après cette addition, nous ajoutons du pyrophosphate de sodium (5 μ l d'une solution à 10^{-4} M).

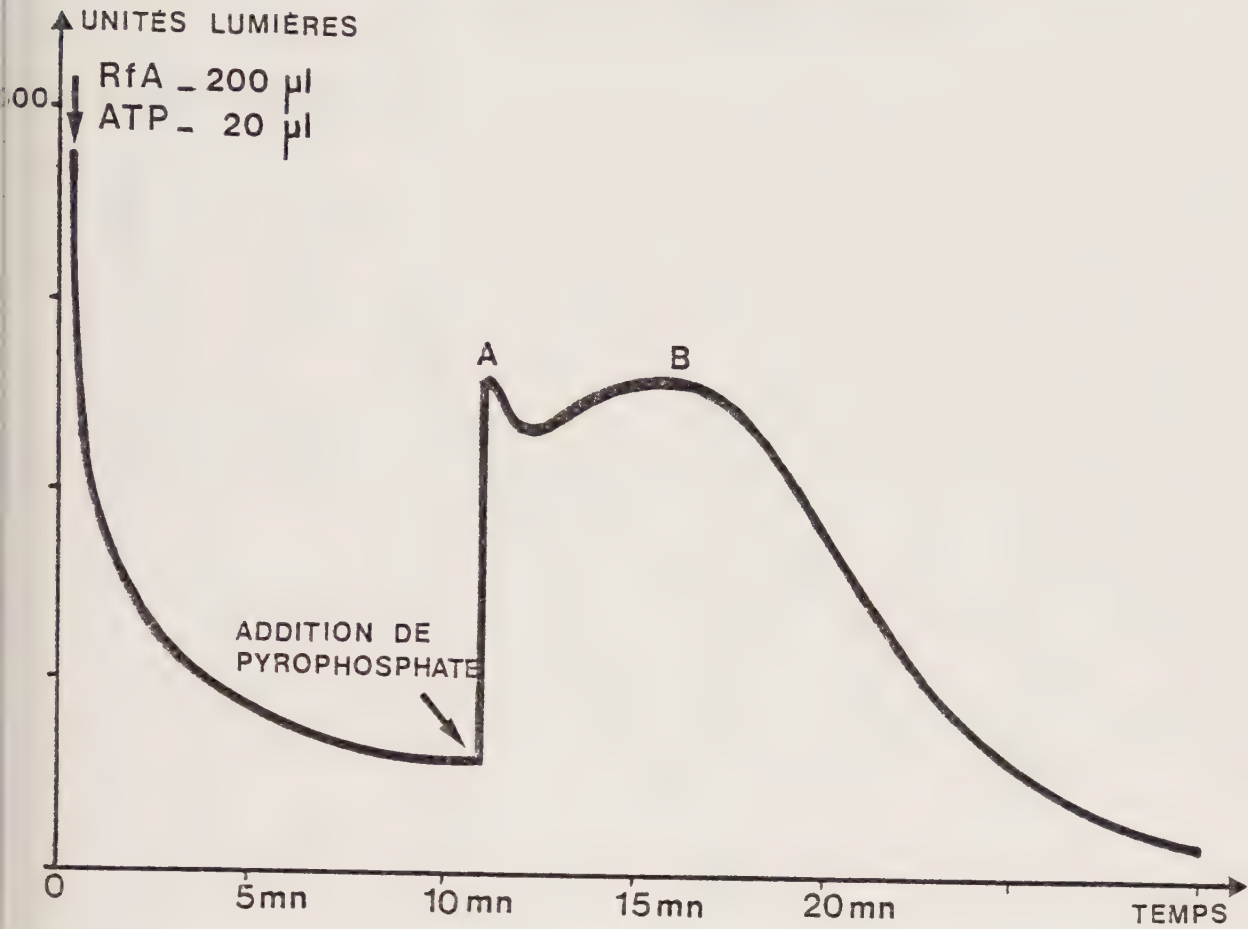
— Résultats.

L'enregistrement de la bioluminescence montre une réponse biphasique analogue à celle décrite par MAC ELROY et HASTINGS (figure 6).

II - 6.2.5. Evaluation de la durée de vie du complexe inactif au cours du premier temps de la réaction proposée par ANTONIK.

D'après le schéma de MAC ELROY et al. (124), l'existence du complexe inactif indique la présence dans le milieu réactionnel de molécules d'ATP libres. Celles-ci peuvent être mises en évidence par l'addition de luciférase qui entraînera la formation du complexe intermédiaire, donc l'apparition d'un pic de bioluminescence.

FIGURE 6
INFLUENCE SUR LA PRODUCTION DE BIOLUMINESCENCE
DE LA DECOMPOSITION DU COMPLEXE INACTIF PAR L'ADDITION
DE PYROPHOSPHATE.



Légende : Au milieu réactionnel comportant 200 microlitres de réactif A et 20 microlitres d'une solution d'ATP à 500 micromoles par litre, 12 minutes après le mélange, 5 microlitres de pyrophosphate 10^{-4} M sont ajoutés.

MISE EN ÉVIDENCE DE LA FORMATION DU COMPLEXE INACTIF

- 200 μ l de RfA

⊕ ↓ 4 μ l d'ATP à 500 μ M/l

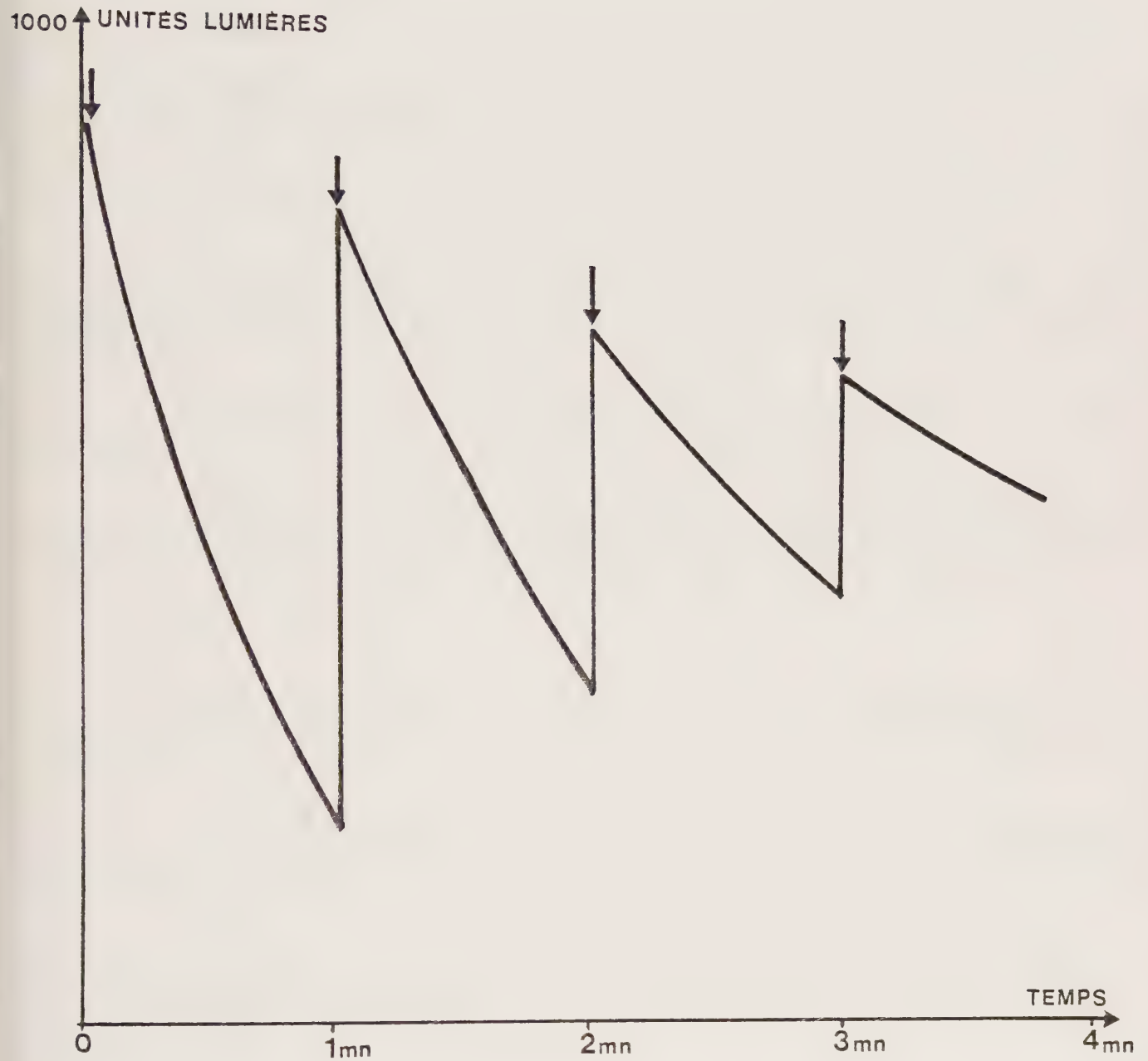


FIGURE 7 - MISE EN EVIDENCE DE LA FORMATION DU COMPLEXE INACTIF.

Légende : A 200 microlitres de réactif A sont ajoutés toutes les minutes, 4 microlitres d'une solution d'ATP à 500 micromoles par litre. A chaque addition le niveau de base - qui est fonction de la quantité de complexe inactif - s'élève.

– *Protocole.*

On prépare 100 tubes renfermant 200 μ l de réactif A et 4 μ l de sang hémolysé.

A intervalle de temps variable, on ajoute à chaque tube 100 μ l de réactif A :

– *Résultats.*

L'amplitude des pics diminue au fur et à mesure de la durée de l'incubation. Ainsi, à la 4ème heure d'incubation, l'addition de Luciférase ne provoque plus de pic.

– *Interprétation.*

Le pic de bioluminescence, après l'addition de la luciférase peut être expliqué par le déplacement de l'ATP du complexe inactif pour former le complexe intermédiaire. En effet l'addition consécutive de plusieurs fois 100 μ l de luciférase entraîne la formation de pics, dont l'amplitude diminue. Donc, la quantité d'ATP disponible dans le milieu réactionnel diminue aussi :

Il semble donc que les pics de bioluminescence soient dûs à la formation du complexe intermédiaire avec la luciférase ajoutée et l'ATP contenues dans le complexe inactif.

L'amplitude des pics diminue au fur et à mesure de la durée d'incubation. Ainsi à la quatrième heure d'incubation, l'addition de luciférase ne provoque plus de pic - donc il semblerait qu'à la quatrième heure d'incubation, le complexe inactif aurait complètement disparu.

II - 6.3. Conclusion.

L'ATP apporté par l'échantillon de sang lors du 1er. temps de la réaction est en partie immédiatement détruit dans le système LL, et en partie masqué dans un complexe inactif qui se forme avec la pyrophosphatase.

Ce complexe se détruit progressivement sous l'action du pyrophosphate formé dans la réaction de bioluminescence et libère de l'ATP qui est consommé. Dans les conditions réactionnelles du screening, la durée de vie de ce complexe inactif est d'environ 4 heures.

Cependant, la bioluminescence persiste à la 20e heure d'incubation d'un mélange de 200 μ l de réactif A et de 4 μ l de sang hémolysé. Il faut donc admettre la production in situ et extemporanée d'ATP, car dès la quatrième heure, le complexe inactif a disparu.

II - 7. INFLUENCE DE LA PRODUCTION ENDOGENE D'ATP.

II - 7.1. Rappels bibliographiques.

On sait que le système LL a une spécificité quasi absolue pour l'ATP (116, 123).

Par conséquent, les autres nucléosides triphosphates (GTP, ITP, UTP, CTP) susceptibles d'être présents soit dans l'extrait brut de luciole, soit dans l'échantillon à doser (sang total) ne se comportent pas comme des substrats du système LL. (119).

En fait, les principales interférences que l'on doit redouter sont celles dues au système enzymatique produisant de l'ATP parallèlement à la réaction de la CK que l'on veut mesurer. Les deux systèmes les plus gênants à ce titre sont : (195, 198).

– Adénylate kinase (EC. 2. 7. 4. 3.) (194)



– Nucléoside diphospho kinase (EC. 2. 7. 4. 6.) (159)



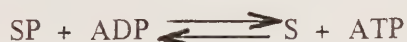
Mais d'autres systèmes peuvent être aussi responsables d'une production endogène d'ATP :

– Nucléoside triphosphate kinase (EC. 2. 7. 4. 10.)



– Nucléoside phosphotransferase (EC. 2. 7. 1. 77.)

De même que les systèmes enzymatiques responsables des phosphorylations liées aux substrats. (5).



L'erreur introduite par la production non spécifique d'ATP, peut être très importante selon la qualité des réactifs et les conditions opératoires.

STREHLER et TOTTER (197) puis RHEE et GREIFNER (159) ont observé avec un extrait brut de luciole un pic de bioluminescence en absence d'ATP et en présence d'une concentration 0,1 mM d'ADP. Cette observation, selon les auteurs, traduit l'existence d'adénylate kinase dans le réactif brut (même si l'on tient compte de la présence éventuelle d'ATP contaminant l'ADP ajoutée).

C'est pourquoi ces auteurs et al. recommandent l'utilisation d'une luciférase purifiée et complètement exempte d'adénylate kinase. Un tel réactif ne devra pas donner de pic de bioluminescence lorsque l'on ajoute de l'ADP.

RHEE et GREIFNER (159) préconisent l'utilisation d'un spectrophotomètre dont la cuve à flux continu, permet la détection du pic initial qui est attribué à la consommation d'ATP existant. La bioluminescence due à l'action des nucléosides diphosphokinase apparait beaucoup plus lentement.

LUNDIN et THORE (111) ont quantifié l'interférence de ces nucléosides et des systèmes enzymatiques qui produisent de l'ATP.

Conséquence de la présence d'adénylate kinase dans le milieu réactionnel au cours du premier temps de la réaction proposée par ANTONIK.

Si l'on tient compte des conditions opératoires dans lesquelles l'ADP est apportée au milieu réactionnel avec la luciférine-luciférase (cf. schéma 12), la présence de l'adénylate kinase a trois conséquences (159) :

- Par la consommation d'ADP, l'adénylate kinase libère l'activité de la pyrophosphatase dont l'ADP est inhibiteur.
- Par la production d'AMP, l'adénylate kinase inhibe la luciférase.
- Par la production d'ATP, l'adénylate kinase interfère avec l'ATP produit par la réaction de la créatine kinase.

Les mêmes auteurs ont montré que pour des concentrations, d'ADP et de GTP d'environ $0,6 \cdot 10^{-7}$ M, les interférences globales obtenues varient de 19 à 100 % selon la luciférase brute employée et le mode de saisie de la bioluminescence.

L'interférence est au maximum de 0,2 % lorsqu'on utilise une luciférase purifiée (159).

En fait l'interférence due aux nucléosides diphosphates transphosphorylases (EC. 2. 7. 4. 6.) et à la pyrophosphatase (EC. 3. 6. 1. 1.) serait plus importante que celle due à l'adénylate kinase, mais elles n'ont pas été quantifiées (111).

II - 7.2. Travaux Personnels.

L'hypothèse présentée dans le paragraphe II - 6.5. est donc en accord avec les données de la littérature. En effet, nous avons montré que pendant les quatre premières heures d'incubation du réactif A en présence de l'échantillon à doser, la bioluminescence est attribuée en majeure partie à la dégradation de l'ATP apportée par l'échantillon : la bioluminescence due à la production endogène d'ATP dans le système : "Réactif A - échantillon", est très faible et ne peut être mise en évidence qu'au moment où le complexe inactif a disparu.

Nous avons tenté de définir l'origine et d'évaluer la valeur relative de la bioluminescence produite par l'ATP formée in situ, afin de montrer son influence sur le déroulement de la réaction globale.

II - 7.2.1. Composants en présence au cours du premier temps de la réaction.

TABLEAU N° 5

Réactif A 200 μ l		Concentration (M/l)			Observations
	LL				1 ml de réactif A correspond à 3 mg. d'organe séché de luciole.
	ADP	10^{-4}			Réactivité des groupements Thiols (96).
	DTT	10^{-3}			
	Acétate de Magnésium	$2 \cdot 10^{-2}$			
	Tampon MOPS	$5 \cdot 10^{-2}$			
	AMP	10^{-4}			
					D'après RHEE et GREIFNER (159)
	Adénylate kinase	?			Activité enzymatique mise en évidence par LUNDIN et THORE (111) et par STREHLER (195).
	Pyrophosphatase.	?			
	Divers	?			
				Ces activités enzymatiques n'ont pas été quantifiées.	
Echantillon 4 μ l		concent. départ	dilution	concent. milieu réaction	
	ATP	$400 \cdot 10^{-6}$	1/50e	$10 \cdot 10^{-6}$	
	ADP	$100 \cdot 10^{-6}$	1/50e	$2 \cdot 10^{-6}$	
	AMP	$50 \cdot 10^{-6}$	1/50e	$1 \cdot 10^{-6}$	
	AK	170 μ /l	1/50e	3,4 μ /l	d'après SZASZ (200)
	Divers	?	1/50e	?	
	CK	?	1/50e	à évaluer	

Composants en présence dans le milieu réactionnel au cours du premier temps de la réaction.

II - 7.2.2. Réactions susceptibles de se produire au cours du premier temps de la réaction.

— Réaction "principale" :

Elle est représentée par la transformation en AMP de l'ATP apportée par l'échantillon. Cette réaction a été précédemment décrite (cf. § II - 6.) elle est responsable de la bioluminescence au cours des 4 premières heures.

Le réactif A ayant une concentration de départ voisine de 0,1 mM d'AMP, la variation de concentration de ce dernier sera négligeable (+ 0,01 mM).

— Réactions "secondaires" :

Elles conduisent à la faible production endogène d'ATP qui est dégradée au fur et à mesure de sa production produisant une faible bioluminescence (cf. schéma 12).

II - 7.2.3. Evaluation de la production endogène d'ATP au cours du premier temps de la réaction.

Il nous a paru délicat, voir impossible de faire la part, de ce qui revient à chaque système enzymatique précédemment décrit (§ II - 7.1.), dans la production endogène d'ATP. Nous nous sommes plutôt attachés à mettre en évidence :

— dans l'expérience N° 1, la production d'ATP à partir des seules activités enzymatiques et des propres substrats contenus dans le réactif A (cf. figure 8).

— dans l'expérience N° 2, la production d'ATP à partir des activités enzymatiques et des substrats contenus dans le mélange de 200 μ l de réactif A, reconstitué de 20 heures, et 4 μ l de globules rouges lavés repris à 50 % dans de la sérum-albumine à 70 g/l (cf. figure 9, courbe N° 2).

— dans l'expérience N° 3, l'interférence des systèmes enzymatiques et des substrats qui sont contenus dans 200 μ l de réactif A reconstitués **extemporanément** et 4 μ l de l'échantillon. (cf. figure 9, courbe n° 3).

— dans l'expérience N° 4, la stabilisation de la production d'ATP après 20 heures d'incubation à la température ambiante du système.

Discussion :

Sur la courbe N° 3, l'amplitude de la bioluminescence observée est beaucoup plus élevée que la somme des amplitudes de bioluminescence des courbes 1 et 2. (Interaction entre les systèmes enzymatiques apportés par l'échantillon de sang et le réactif A).

On peut donc en déduire, que pendant les 20 heures qui suivent sa reconstitution, certains systèmes enzymatiques du réactif A se "stabilisent". Après 20 heures, la bioluminescence du mélange est négligeable.

Il peut s'agir, soit d'une diminution d'activité de LL ou de la pyrophosphatase, soit une diminution de l'activité du système enzymatique produisant de l'ATP, soit encore l'addition de ces deux phénomènes. Il faut cependant noter que, après 20 heures d'incubation de 200 μ l de

FIGURE 8 - BIOLUMINESCENCE PRODUITE PAR LE REACTIF A
APRES RECONSTITUTION

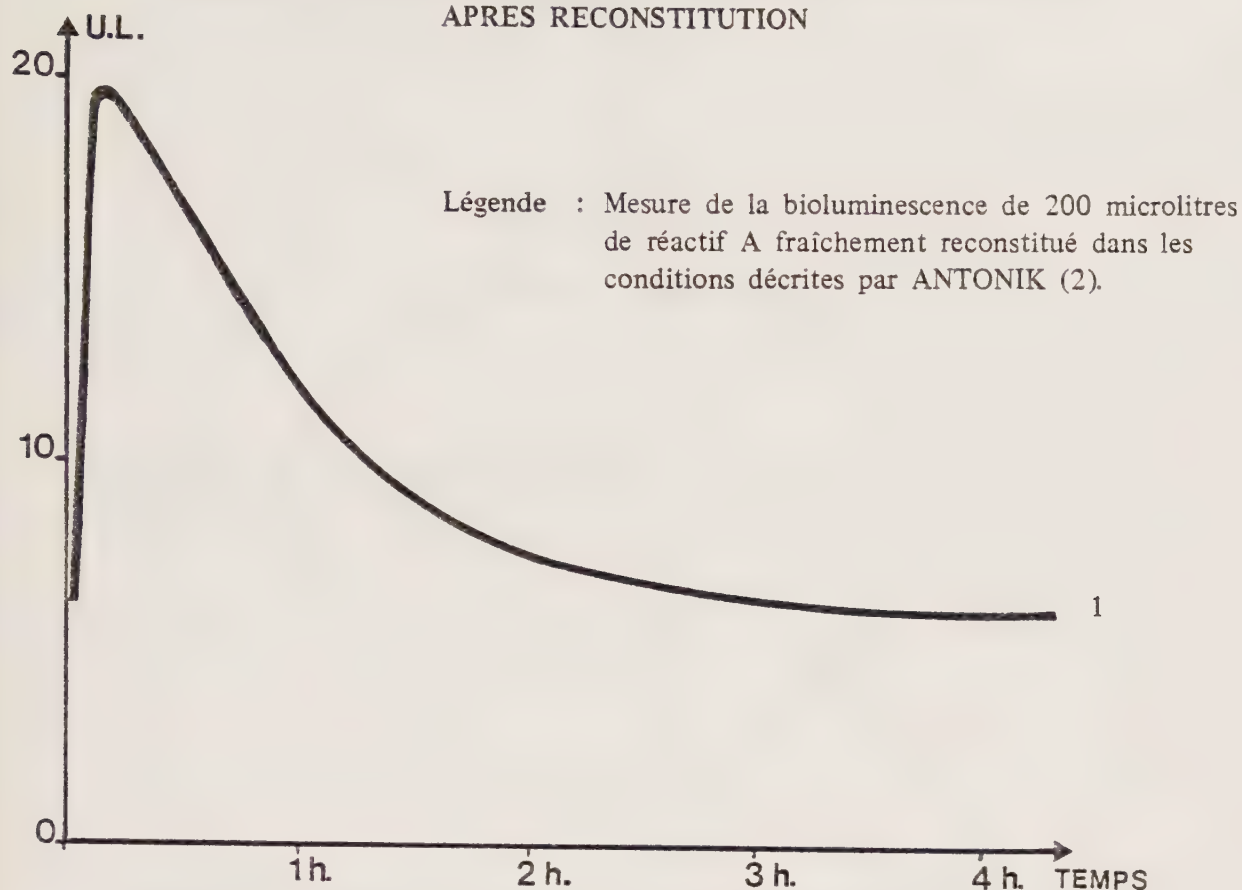
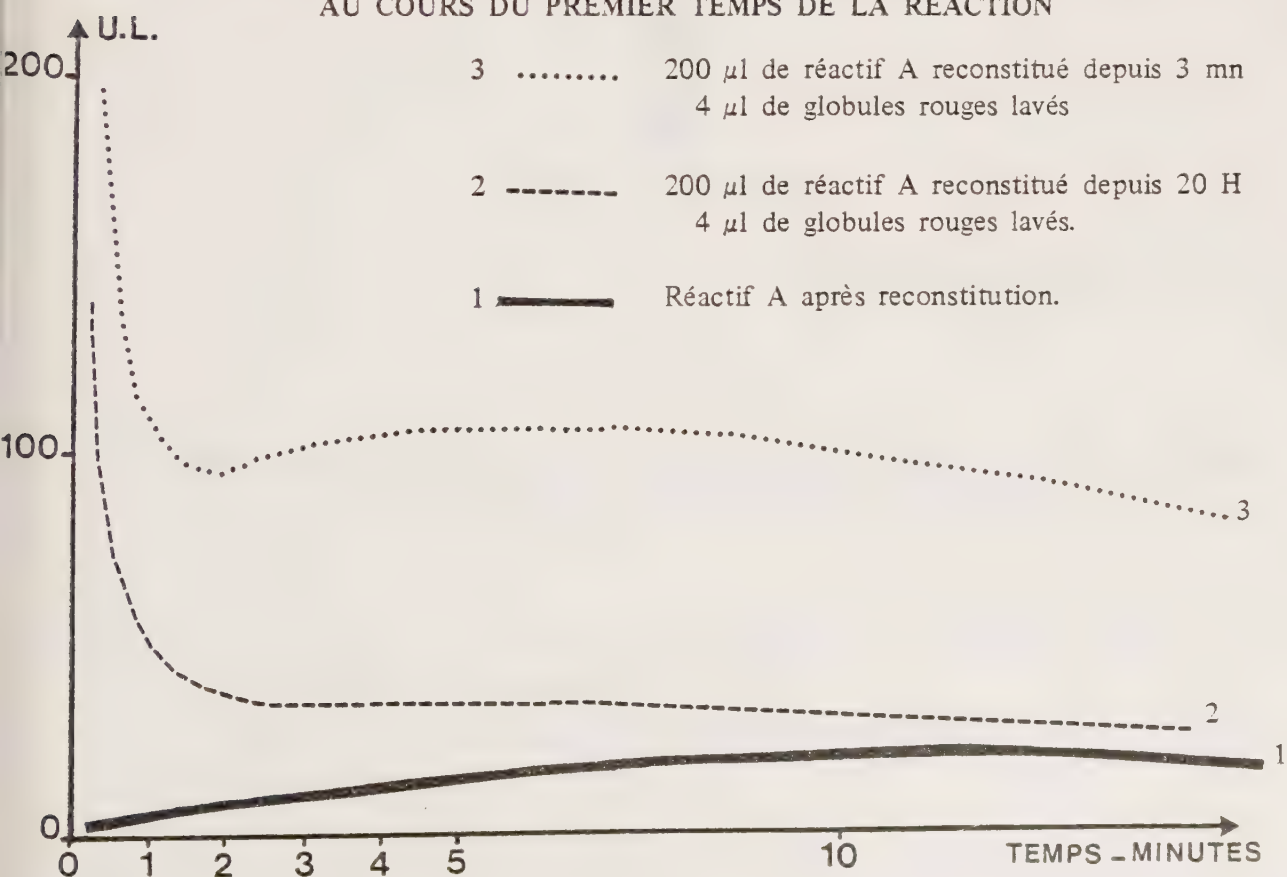
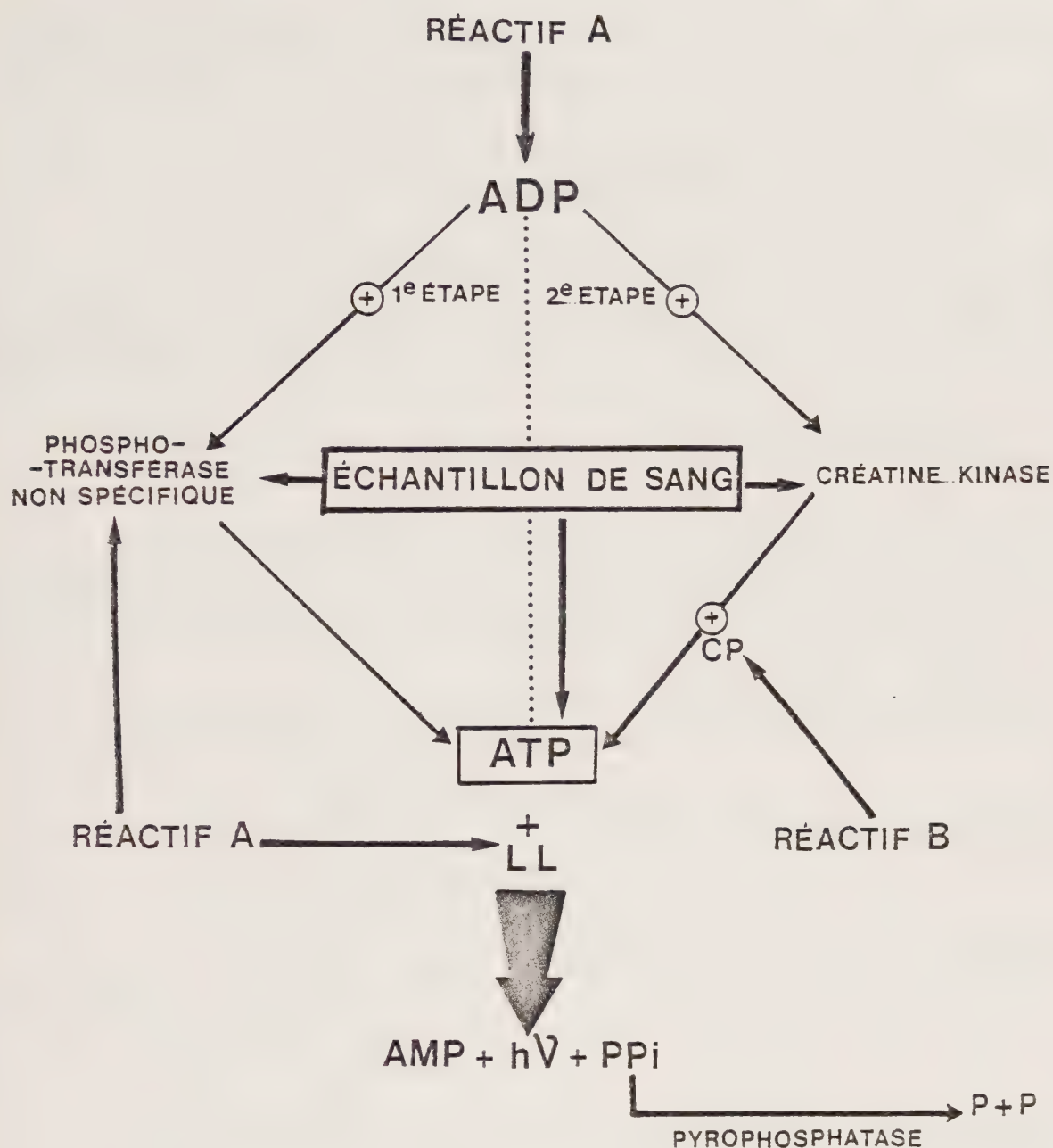


FIGURE 9 - EVALUATION DE LA PRODUCTION ENDOGENE D'ATP
AU COURS DU PREMIER TEMPS DE LA REACTION





SCHEMA 12

SCHEMA DES REACTIONS SE DEVELOPPANT AU COURS DES DEUX ETAPES SUCCESSIVES DE LA REACTION DE SCREENING.

Légende : 1^{ère} étape : consommation de l'ATP apportée par l'échantillon et formée in situ par des phospho-transférases non spécifiques.
 2^{ème} étape : production d'ATP par la CK de l'échantillon de sang et la CP apportée par le réactif B.

réactif A et de l'échantillon, la bioluminescence se situe aux alentours de 4 UL, alors que l'addition d'ATP provoque un pic important de bioluminescence.

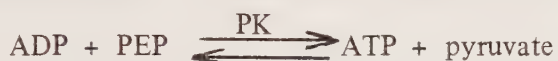
II - 7.2.4. Production d'ATP par l'AK et par d'autres systèmes enzymatiques non spécifiques au cours du premier temps de la réaction.

— Après 20 heures d'incubation de 200 μ l de réactif A en présence de l'échantillon, l'addition de 50 μ l d'une solution d'ADP 0,1 mM au mélange réactionnel entraîne l'apparition d'un pic de bioluminescence - ce qui traduit une activité résiduelle importante des nucléosides diphosphotransférase ou de l'adénylate kinase (ou encore la présence d'ATP dans l'ADP).

a) Consommation de l'ADP et production d'AMP au cours du premier temps de la réaction :

— afin de suivre au cours du premier temps de la réaction la consommation de l'ADP et l'apparition de l'AMP, nous avons tenté de doser ces molécules dans le réactif A fraîchement préparé, et après des temps d'incubation variables. La chromatographie sur colonne n'a pu être réalisée. Nous avons donc fait appel à la méthode enzymatique proposée par BERGMEYER en 1975 (11) :

— après défécation de l'échantillon par l'acide perchlorique 0,1 N et neutralisation du milieu réactionnel, l'ADP est dosée par la réaction :



PK = Phosphoenol pyruvate kinase



— dans un deuxième temps, l'AMP est transformée dans le milieu réactionnel en ADP par la réaction :



Les molécules d'ADP ainsi formées entrent dans le système de réactions précédentes.

Après avoir contrôlé la technique sur un échantillon de sang, nous avons traité le réactif A selon les conditions opératoires décrites dans la technique (11).

Toutes les absorbances mesurées étaient voisines de 2 - les résultats furent ininterprétables. Cette absorption anormale a été attribuée à la présence d'une grande quantité de luciférine dans le défécate. En effet, comme l'ont montré DENBURG et al. (49) en travaillant sur des solutions de luciférine-luciférase préparées selon les méthodes de MAC ELROY, la luciférine liée ou non à la luciférase absorbe à 350 nm. Une absorption importante entre 320 nm et 390 nm a été retrouvée sur le défécate à analyser.

Une dilution au 1/10e du défécate n'améliore pas la technique. Une dilution au 1/100e n'est pas envisageable compte tenu de la perte de sensibilité qu'elle entraîne.

Devant les difficultés d'évaluation de l'activité de l'AK, son inhibition a été tentée en postulant que l'AK apportée par le réactif A donc extraite de la luciole, se comporte comme de l'AK d'origine humaine.

b) Essai d'inhibition de l'adénylate kinase.

Lorsque l'on reprend le réactif A lyophilisé par une solution d'ADP 0,9 mM, la concentration finale d'ADP dans le réactif A est de 1 mM. La bioluminescence résiduelle observée après 20 heures, est de 77 UL au lieu de 4 UL (observée avec le réactif A apportant 0,1 mM d'ADP).

Nous avons tenté d'abaisser cette bioluminescence résiduelle en ajoutant un inhibiteur de l'AK comme les fluorures à la concentration de 25 mM (170), ou comme l'AMP à la concentration de 10 mM (le rapport AMP/ADP étant supérieur à 5, l'AK serait inhibée d'après ROSALKI (169)).

Aucune diminution de la bioluminescence résiduelle n'a été observée. Donc l'inhibition n'est pas obtenue dans ces conditions.

De plus, l'AMP est inhibiteur de :

- la créatine kinase à la concentration de 10 mM (199),
- la LL à la concentration de 1 mM (159, 195),
- la pyrophosphatase pour des concentrations supérieures à 0,1 mM (196).

Cette donnée a été vérifiée par une constatation personnelle : à la 20e heure, le niveau de base de bioluminescence est **inversement** proportionnel à la quantité d'ATP de départ :

Concentration d'ATP dans le milieu réactionnel μM	Bioluminescence mesurée à la 20e heure (UL)
10	4,0
20	3,1
30	2,4
40	2,0

Donc, plus la quantité d'ATP apportée par l'échantillon de sang est importante, plus la bioluminescence est faible. Ce résultat paradoxal, est probablement dû au fait que l'AMP produit, pourrait inhiber la pyrophosphatase. Le pyrophosphate s'accumulerait et inhiberait la formation du complexe intermédiaire : "E - LH2 - AMP", ou bien, comme l'admettent ADDIS et ANTONIK (1), l'AMP interviendrait en inhibant l'adénylate kinase principale origine endogène de l'ATP.

II - 7.3. Conclusions.

Au cours de la première étape de la réaction de screening, les principales réactions sont :

- au cours des premières secondes suivant le mélange du réactif A et de l'échantillon :
 - . destruction d'une partie de l'ATP ajouté avec production de bioluminescence,
 - . incorporation d'une autre partie de l'ATP dans un complexe inactif dont la durée de vie est d'environ 4 heures.

— Pendant les 4 premières heures d'incubation :

- . décomposition progressive du complexe inactif avec régénération du complexe intermédiaire qui produit une bioluminescence stable.
- . destruction, sous l'action d'une pyrophosphatase, du pyrophosphate formé.
- . Production endogène d'ATP.

— Après la 4^e heure d'incubation, la production endogène d'ATP est responsable d'une bioluminescence résiduelle qui persiste pendant 20 heures.

Il faut noter, que l'activité de la pyrophosphatase est indispensable au bon déroulement du CK.screening.test : en effet, la pyrophosphatase détruit le pyrophosphate formé au cours du premier temps de la réaction et ainsi, le complexe intermédiaire peut se former plus facilement avec l'ATP produit au cours du deuxième temps de la réaction, sous l'action de la créatine kinase. C'est probablement la raison principale pour laquelle le CK screening test ne peut être réalisé avec de la luciférase purifiée (les essais ont été pratiqués en employant de la luciférase purifiée SIGMA ou LUMAC).

Après 20 heures d'incubation à la température du laboratoire de 200 μ l de réactif A en présence de l'échantillon, la bioluminescence est devenue très faible, traduisant une production d'ATP négligeable.

L'addition de réactif B, en apportant la créatine phosphate à la concentration de 0,02 M dans un tampon MOPS 0,05 M pH 7,3, fournit à la créatine kinase apportée précédemment par l'échantillon à analyser, son seul substrat spécifique. Donc la quantité d'ATP produite à ce temps de la réaction, ne dépend plus que de l'activité de la créatine kinase de l'échantillon à analyser.

Nous avons montré que le réactif A ne contenait pas d'activité correspondant à la créatine kinase. (la bioluminescence produite par le mélange de 200 μ l de réactif A et de 50 μ l de réactif B reste voisine de 4 UL).

II - 8. PERFORMANCES DE LA REACTION ATP/LL.

Ces performances ont été étudiées dans les conditions de la réaction de screening qui ne sont pas des conditions réactionnelles optima de la réaction ATP/LL.

II - 8.1. Linéarité.

II - 8.1.1. Données bibliographiques.

Il apparaît que les résultats sont très différents selon les conditions opératoires et la pureté des réactifs employés. En utilisant de la luciférine-luciférase, préparée selon les méthodes de MAC ELROY et COULOMBRE (121), STREHLER et TOTTER ont obtenu une relation linéaire entre la quantité d'ATP contenu dans le mélange réactionnel d'une part, et l'intensité de l'émission initiale ou la quantité totale de bioluminescence produite d'autre part. (197).

Les conditions expérimentales et en particulier le temps écoulé entre l'addition des réactifs et la mesure de la bioluminescence, sont très variables d'un auteur à l'autre.

— STANLEY et WILLIAMS (189) proposent de démarrer le comptage dès le mélange. Ainsi ces auteurs obtiendraient une relation linéaire entre le logarithme de la concentration en ATP et le logarithme du nombre de coups en 6 secondes, mesurés à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide modèle 3375 PACKARD TRI-CARB.

— LUNDIN et THORE (111) évaluent la bioluminescence à l'aide d'un photomultiplicateur PHILIPS PM 2007.

Ces auteurs proposent de mesurer :

- . la vitesse initiale maximum,
- . le maximum de l'intensité lumineuse
- . l'intensité de la bioluminescence 150 secondes après le mélange,
- . enfin la moyenne des intensités lumineuses pendant les 150 premières secondes.

Quelque soit le mode de mesure de l'intensité lumineuse, ces auteurs obtiennent une relation linéaire entre la bioluminescence mesurée et la concentration d'ATP ajoutée dans le milieu réactionnel.

— RHEE et al. (159) obtiennent une relation linéaire entre le logarithme de l'amplitude relative de bioluminescence mesurée avec un spectromètre à flux continu AMINCO MORROW et le logarithme de la concentration en ATP.

— KIMMICH et al. (99) utilisent une préparation de luciférine luciférase qui a été adsorbée sur un gel de phosphate tricalcique. Ces auteurs utilisent une luciférase préparée par SIGMA, mais préalablement apauvrie en arseniate (5 à 10 mM, au lieu de 50 mM) et amenée à pH 8. La lecture de la bioluminescence est réalisée à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide BECKMAN LS 230 pendant 30 secondes, la lecture débutant 20 secondes après l'injection. Ces auteurs, dans les conditions décrites, montrent qu'il existe une relation linéaire entre le nombre de coups par minute et le carré de la concentration en ATP, lorsque celle-ci est comprise entre 4 et 20 picomoles/litre.

— JABS et FERRELS réalisent une seule lecture à l'aide du biomètre DUPONT 760 deux secondes après le mélange. Les résultats montrent une relation linéaire entre le log. de la bioluminescence et le log. des concentrations en ATP lorsqu'elles sont comprises entre 100 nmol/l et 100 μ mol/l.

— Enfin, il faut mentionner les résultats de LEE, JABLONSKI et DE LUCA (107) qui ont obtenu une relation linéaire entre la bioluminescence mesurée avec un spectrophotomètre CHEM GLOW AMINCO et des concentrations en ATP comprises entre 10^{-8} et 10^{-4} M. Ces auteurs ont utilisé de la luciférase fixée sur des billes de verre-alkylamine. La luciférase ayant été fixée par la réaction à la glutaraldéhyde.

Le pic d'émission à 617 nm (Le pH optimum de la luciférase se situe à 7,8) apparaît 3 minutes après le mélange.

Les résultats discordants rencontrés dans la littérature tendent à prouver que les conditions opératoires mises en oeuvre sont déterminantes, mais une conclusion simple pour l'utilisation pratique de la réaction, n'est pas immédiate.

II - 8.1.2. Travaux personnels :

Nous avons repris les conditions expérimentales décrites par HWANG (89) :

— des solutions standards d'ATP sont préparées à des concentrations comprises entre 1 à 200×10^{-8} M.

— dans un tube calibré, sont ajoutées :

- . 50 μ l de solution d'ATP standards
- . 200 μ l de réactif A reconstitué de une heure.

— le mélange est agité 3 secondes au Vortex, laissé 12 secondes à la température ambiante, et l'émission lumineuse est mesurée 15 secondes exactement après le mélange à l'aide du spectrophotomètre CHEM GLOW AMINCO.

— les valeurs obtenues sont portées dans le tableau 6.

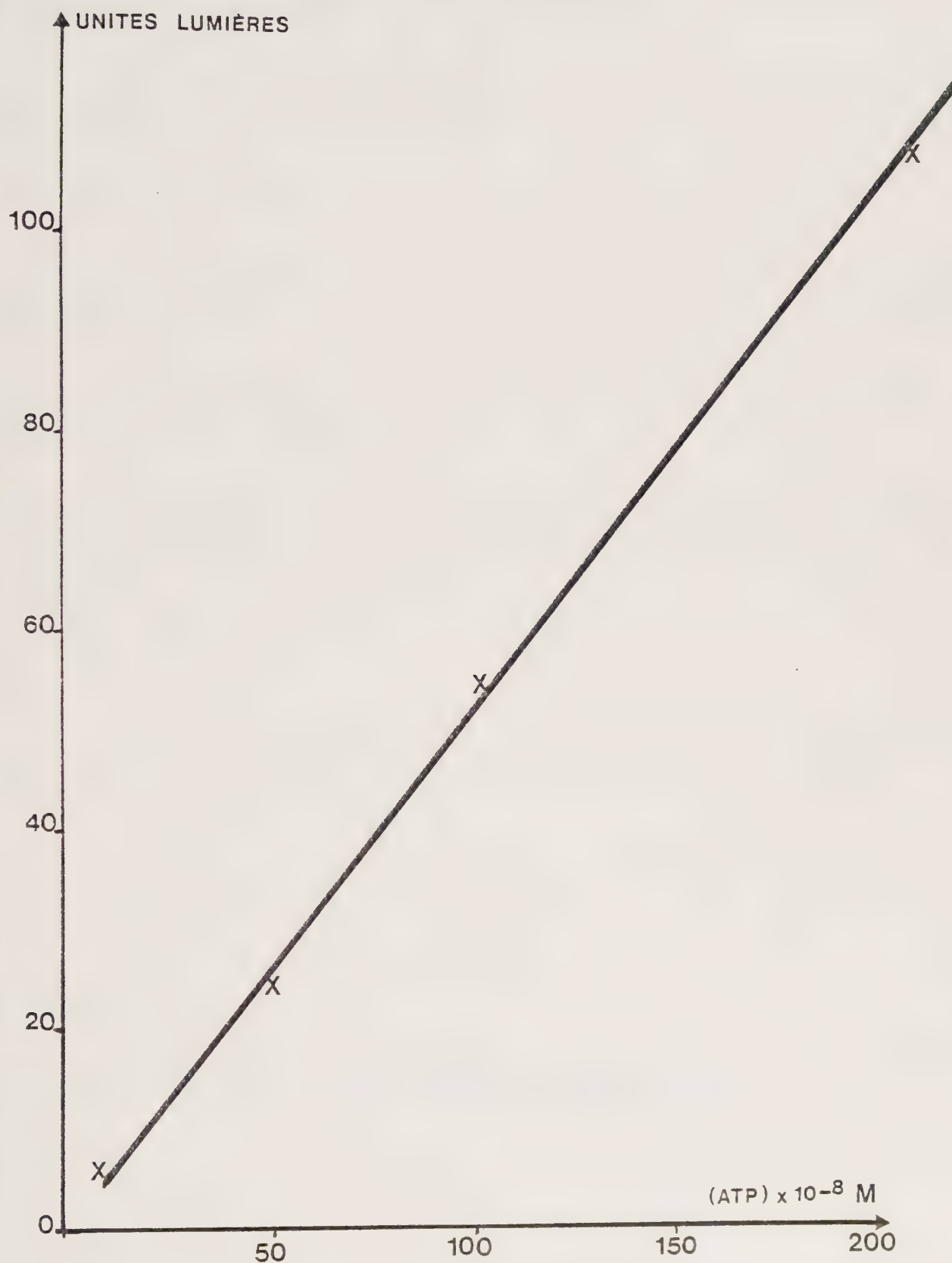
La courbe est représentée figure 10.

TABLEAU N° 6

LINEARITE DE LA REACTION ATP-LL

Concentration d'ATP dans l'échantillon (10^{-8} M/l)	Bioluminescence mesurée 15 secondes après le mélange - Moyenne de 20 essais (UL)
1	0,82
5	2,83
10	3,42
50	22,5
100	53,7
200	117,45

LINÉARITÉ DE LA RÉACTION ATP-LL



Légende : dans les conditions opératoires décrites, nous obtenons une relation linéaire entre la concentration en ATP de l'échantillon et l'intensité de la bioluminescence produite.

Alors que HWANG (89) obtenait une relation logarithmique entre l'intensité de la bioluminescence à la 15^e seconde, et la concentration d'ATP (pour des concentrations inférieures à 10×10^{-8} M), nous obtenons dans des conditions opératoires identiques, une relation linéaire pour des concentrations supérieures à 10×10^{-8} M d'ATP (cf. figure 10).

Pour des concentrations d'ATP inférieures, le bruit de fond prend une part de plus en plus importante de la lumière mesurée. Nous n'avons donc pas pris en compte les résultats obtenus, alors que HWANG les utilise.

II - 8.2. Détectabilité de l'ATP – Données bibliographiques :

– BEUTLER et BALUDA (14) en utilisant l'extrait de LL préparé selon la méthode de MAC ELROY et COULOMBRE décellent une concentration de 10^{-6} M d'ATP dans 1 ml de mélange réactionnel, soit une quantité de 10^{-9} Moles à l'aide d'un photomultiplicateur TURNER model 110.

– STREHLER (194) et LYMAN et al. (112) abaissent le seuil de détectabilité à 2 picomoles d'ATP dans l'échantillon en utilisant les mêmes réactifs, mais en détectant la bioluminescence à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide.

– RHEE et al. (159) ont multiplié par 50 ou 100 le seuil de détectabilité de l'ATP en ajoutant 0,27 mM de luciférine à l'extrait brut. De plus en enregistrant l'amplitude du pic initial sur un spectrophotomètre AMINCO MORROW, ces auteurs parviennent à détecter 10^{-12} M d'ATP dans un milieu réactionnel minimum de 0,8 ml contenant :

. tampon glycylglycine	30 mM	
. Mg++	40 mM	
. Arseniate	1,25 mM	pH : 7,4.

– LEE et al. (107) en utilisant de la luciférase fixée sur des billes de verre-alkylamines mesurent avec précision 10^{-8} M d'ATP à l'aide d'un photomètre CHEM GLOW AMINCO.

Le milieu réactionnel contient :

. luciférine :	0,05 mM	
. tampon glycylglycine	0,025 M	
. MgCl ₂	0,05 M	pH : 7,8.

II - 8.3. Précision – Travaux personnels.

En réalisant 20 dosages de solutions contenant des concentrations variables d'ATP selon le protocole décrit (§ II-8.1.2.), nous avons obtenu la répétabilité suivante :

TABLEAU N° 7
PRECISION DE LA REACTION ATP – LL

Concentration d'ATP dans l'échantillon. (10 ⁻⁸ M)	Nombre de mesures réalisées sur le même échantillon	Valeur Moyenne (UL)	Ecart-Type (UL)	CV (%)
200	20	117,45	10,3	8,7
100	20	53,7	5,8	10,8
50	20	22,5	1,8	8
10	20	3,42	0,47	13,7

Compte tenu de l'instabilité des solutions d'ATP, il ne nous a pas été possible de réaliser des essais de reproductibilité.

II - 8.4. Exactitude – Données bibliographiques.

Etant donné la difficulté pour obtenir des échantillons d'ATP parfaitement purs, l'étude de l'exactitude de la réaction de bioluminescence utilisée comme méthode de dosage de l'ATP, ne peut être réalisée que comparativement à d'autres méthodes de dosage de l'ATP considérées donc comme des méthodes de référence.

– Les méthodes les plus courantes de dosage de l'ATP dans les milieux biologiques et plus particulièrement dans le sang sont :

- . La chromatographie sur colonne
- . Les méthodes enzymatiques.

BEUTLER et BALUDA (14) ont montré que les résultats dépendaient autant de la méthodologie que du traitement préalable de l'échantillon.

Ces auteurs ont obtenu des résultats plus élevés en réalisant le dosage par la technique à la Luciférine-Luciférase.

Cette surestimation (de l'ordre de 20 %) a été attribuée par ces auteurs à une fluorescence secondaire due aux protéines dénaturées ou à l'hémoglobine apportée dans le milieu réactionnel par l'échantillon.

Cette cause d'erreur n'influe pas sur la détermination de l'activité de la CK dans la méthode de screening proposée. (2).

II - 8.5. Conclusions.

Malgré l'utilisation de réactif non purifié, la réaction ATP/LL est linéaire entre 10 et $200 \cdot 10^{-8}$ M et sa limite de détectabilité est d'environ $0,2 \cdot 10^{-8}$ M/l.

Il faut noter que le pic de bioluminescence est très rapide et que dans les conditions du screening, l'ATP est continuellement produit dans le milieu réactionnel.

★○★

CHAPITRE III.

*

ETUDE DE LA REACTION DE COUPLAGE : CK - ATP - LL

La spécificité et la sensibilité de la réaction de bioluminescence produite par le système ATP/LL est à l'origine de nombreuses applications.

— La littérature rapporte plus de 70 publications concernant le dosage direct de l'ATP dans des milieux biologiques très divers (humus du sol, organe, culture de tissus, culture de cellules, sang, urines, lait, sperme), et dans des microorganismes très variés (algues (193) plancton, bactéries (31), virus.....).

— En 1968, STREHLER (195) propose l'application de la réaction ATP/LL à la détection de l'ATP produite par une réaction couplée, permettant soit le dosage d'un substrat (ADP, AMP, CP, Glucose, Phosphoénol-pyruvate, nucléotides triphosphates, soit l'évaluation d'activités enzymatiques dont un produit de réaction est l'ATP.

— Les premiers essais d'évaluation de la CK en détectant l'ATP produit par la réaction ATP/LL ont été réalisés sur le muscle de l'embryon de poussin (195).

— En 1974, WITTEVEEN et al. (215) mettent en évidence la différence des cinétiques enzymatiques des isoenzymes MM, MB et BB en mesurant l'ATP produit par le système ATP/LL. Les isoenzymes MB, MM et BB qui ont une même activité enzymatique mesurée avec la méthode de ROSALKI (169) présentent dans le milieu réactionnel proposé, des activités enzymatiques très différentes. La bioluminescence est mesurée à l'aide d'un photomètre CHEM GLOW AMINCO.

La ligne de base qui est enregistrée avant l'addition de CP, correspond à la production d'ATP par l'AK présente dans l'échantillon. Ainsi cette activité peut être déduite de la bioluminescence mesurée après l'addition de CP qui est le substrat spécifique de la CK.

Les concentrations de substrat optimum ont été évaluées par les auteurs : (cf. tableau 8).

Par ailleurs, LEE et al. (107) révèlent l'activité de la CK en mesurant l'ATP formée par la luciférase fixée sur des billes de verre-alkylamines.

L'ATP produit par la réaction de la CK peut donc être révélée :

— soit par un système de réactions enzymatiques couplées aboutissant à la formation de NADPH + dont on évalue l'absorbance à 340 nm,

— soit par la réaction de bioluminescence ATP/LL.

Il nous a semblé intéressant de comparer les conditions réactionnelles utilisées selon chaque type de méthode de révélation de l'ATP. (tableau 8).

TABLEAU 8

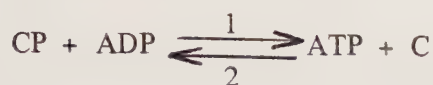
CONDITIONS REACTIONNELLES SELON LES METHODES DE REVELATION
DE L'ATP FORME PAR LA CK.

Conditions réactionnelles	Méthode de ROSALKI OLIVER (169).	Méthode recommandée par SFBC (129).	Méthode décrite par WITTEVEEN (215).	Méthode décrite par ANTONIK (2).	Méthode décrite par LEE et al. (107).
température °C.	30 - 37	30	non précis.	non précis.	non précis.
pH à la température de la réaction.	6,8	6,6	7,8	7,3	7,8
Tampon	Tris HCl	Acétate d'imidazole.	Tris HCl	MOPS	Glycylglycine
Molarité (mM)	50	100	25	50	25
Activateurs des groupements Thiols.	cystéine	N Acétyl cystéine.	2-Mercapto-Ethanol	Dithiotreithol	0
concentration (mM).	74	20	2	1	0
Sels de Mg. (mM).	30	10	5	20	5
AMP (mM)	10	20	?	?	?
ADP (mM)	1	2	0,1	0,1	10
CP (mM).	10	30	10	20	1
Rapport de dilution du sérum dans le milieu réact.	1/30	1/30	1/22	1/130	non précis.
Réaction révélatrice.	NADPH ⁺ H ⁺	NADPH ⁺ H ⁺	ATP + LL réactif purifié.	ATP + LL réactif brut.	ATP + LL réactif purifié.
Délai de Mesure			20 sec.	30 min.	20 sec.

III - 1. CONDITIONS OPERATOIRES.

III - 1.1. Choix du pH.

Dans la réaction catalysée par la créatine kinase :



Le pH optimum de la réaction 1 se situe aux alentours de 6,6 - 6,8 ; par contre le pH optimum de la réaction 2 se situe à 9 - 9,5.

WONG et SMITH (216) ont montré qu'à pH 7,5, les réactions 1 et 2 présentent les mêmes activités, aussi bien pour l'isoenzyme MM que MB.

Cependant, quand le pH passe de 6,5 à 7,5, alors que la pKm de l'ADP pour l'isoenzyme MB est doublée, la pKm de l'ADP pour l'isoenzyme MM diminue de 3 fois sa valeur. L'influence du pH sur les variations des Km du CP sont moins nettes pour l'isoenzyme MM que MB.

Le pH optimum de la réaction ATP/LL se situe aux alentours de 7,8. Pour un pH inférieur à 6,8, l'émission n'a plus lieu dans le jaune-vert (562 nm), mais dans le rouge (617 nm). Il est donc exclu de réaliser la réaction de couplage CK - ATP - LL aux conditions de pH optimum pour la CK. Les pH retenus par ANTONIK et WITTEVEEN sont donc un compris entre les pH optimum de la CK et de la LL.

Ainsi, à pH 7,3, la luciférase perd 10 % de son activité par rapport au pH de 7,8 (et la CK perd environ 20 % de son activité (129)).

III - 1.2. Choix du tampon — Données bibliographiques (196 - 197).

Le choix du tampon est surtout déterminé par le pH que l'on veut imposer au milieu réactionnel. Nous avons pu constater que les tampons employés au cours de la préparation de la LL sont très divers - et leur molarité varie de 30 à 100 mM.

Les essais d'optimisation ont montré que le tampon IMIDAZOLE-ACETATE 100 mM, est le plus favorable à l'activité de la CK (129).

III - 1.3. Choix du sel de magnésium — Données bibliographiques (73 - 198).

Nous avons vu que les sels de magnésium sont indispensables à l'activité de la LL. Le rapport optimal $\text{Mg}^{++} / \text{ADP}$ pour l'activité de la CK comme pour l'activité de la LL, se situe entre 10 et 20 mM.

III - 1.4. Choix de la concentration en ADP.

III - 1.4.1. Données bibliographiques.

La forte concentration d'ADP (10 mM) employée par LEE et al. (107) peut s'expliquer par :

— le déroulement de la réaction en phase hétérogène (la production d'ATP a lieu en phase liquide, et l'ATP formé réagit avec la luciférase fixée aux billes de verre).

— l'utilisation de la luciférase purifiée et de créatine kinase purifiée qui évite d'introduire dans le milieu réactionnel de l'Adénylate kinase.

Une telle concentration d'ADP (10 mM) pour être utilisée avec le réactif brut, nécessiterait l'inhibition de l'adénylate kinase (cf. § II. 7.2.4.) ainsi ROSALKI propose l'inhibition de l'adénylate kinase par l'AMP à la concentration de 0,01 M qui serait également inhibitrice du système LL dans la réaction de couplage CK - ATP - LL (169).

WITTEVEEN et al. (215) proposent une concentration d'ADP 10^{-4} M, qui est proche de la K_m de la créatine kinase (8×10^{-4} M mesuré à pH 7,0 en tampon glycylglycine à 30°C) et qui est inférieure à la K_m de l'adénylate kinase ($1,58 \times 10^{-3}$ M mesuré à pH 7,25 en tampon Tris HCl à 30 ° C). Selon ces auteurs, l'AK interfère peu ou pas dans ces conditions.

III - 1.4.2. Travaux personnels .

Nous avons modifié la composition du réactif A en reconstituant le lyophilisat avec des solutions aqueuses d'ADP à la concentration de 0,1 - 0,4 - 0,9 - 1,4 - 1,9 mM. Les solutions finales de réactif A obtenues ont respectivement des concentrations de 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1 - 1,5 - 2 mM. Nous avons utilisé ce réactif dans les conditions opératoires proposées par ANTONIK en utilisant un sang dont l'activité de la CK était très élevée. Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 9 :

TABLEAU N° 9

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ADP DU REACTIF A
SUR LA SENSIBILITE DE LA REACTION CK - ATP - LL

Concentration en ADP dans le milieu réactionnel (mM).	Bruit de Fond à la 20e heure (UL) (n : 10)	Bioluminescence 30 min. après l'addition du réactif B (UL). Le bruit de fond a été déduit. (n : 10).
0,1	2	1 170
0,2	2	1 190
0,5	27	810
1	74	770
1,5	110	620
2	320	430

Nous observons que le bruit de fond augmente alors que la bioluminescence attribuée à la CK diminue. En utilisant des concentrations d'ADP optimum pour la CK (2 mM) l'interférence de l'AK entraîne une perte très importante de la sensibilité.

La diminution de la bioluminescence rapportée par WITTEVEEN et al. (215) (cf. figure 11), a de fortes concentrations d'ADP peut s'expliquer par une diminution de la différence entre la bioluminescence totale et la bioluminescence du bruit de fond que l'on observe lorsque les concentrations d'ADP se rapprochent de la K_m de l'adénylate kinase (les auteurs ne précisent pas les valeurs du bruit de fond qu'ils ont obtenus).

La concentration d'ADP choisie (0,1 mM) par WITTEVEEN et ANTONIK et que nous avons vérifiée être la concentration optimum, évite l'interférence de l'AK et l'apparition au cours du premier temps de la réaction d'une concentration inhibitrice d'AMP sur la pyrophosphatase (196).

III - 1.5. Choix de la concentration en créatine-phosphate - Travaux personnels.

WITTEVEEN et al. (215) obtient une inhibition de la CK (figure 12) par de fortes concentrations de CP. Ce phénomène ne s'explique pas facilement, personnellement nous avons retrouvé cette inhibition en travaillant selon les conditions opératoires proposées par ANTONIK. (tableau 10).

TABLEAU N° 10

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CP DU REACTIF B SUR LA SENSIBILITE DE LA REACTION CK - ATP - LL

Concentration en CP apportée dans le milieu réactionnel par l'addition du réactif B. (mM).	Bioluminescence mesurée 30 min. après l'addition du réactif B. (UL).
20	59
40	62
80	35
120	20

Il faut noter que ces concentrations de CP ne sont pas inhibitrices de la CK quand la concentration en ADP est de 1 à 2 mM comme dans les conditions réactionnelles décrites par OLIVER et ROSALKI (196).

Les concentrations d'ADP employées par WITTEVEEN et al. et ANTONIK sont 10 à 20 fois plus faibles, ce qui pourrait expliquer l'effet inhibiteur obtenu avec de fortes concentrations de CP.

FIGURE 11 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ADP SUR L'ACTIVITE DES ISOENZYMES DE LA CK (tiré de WITTEVEEN - SOBEL - DE LUCA) (215)

La concentration en créatine phosphate a été fixée à 10 mM

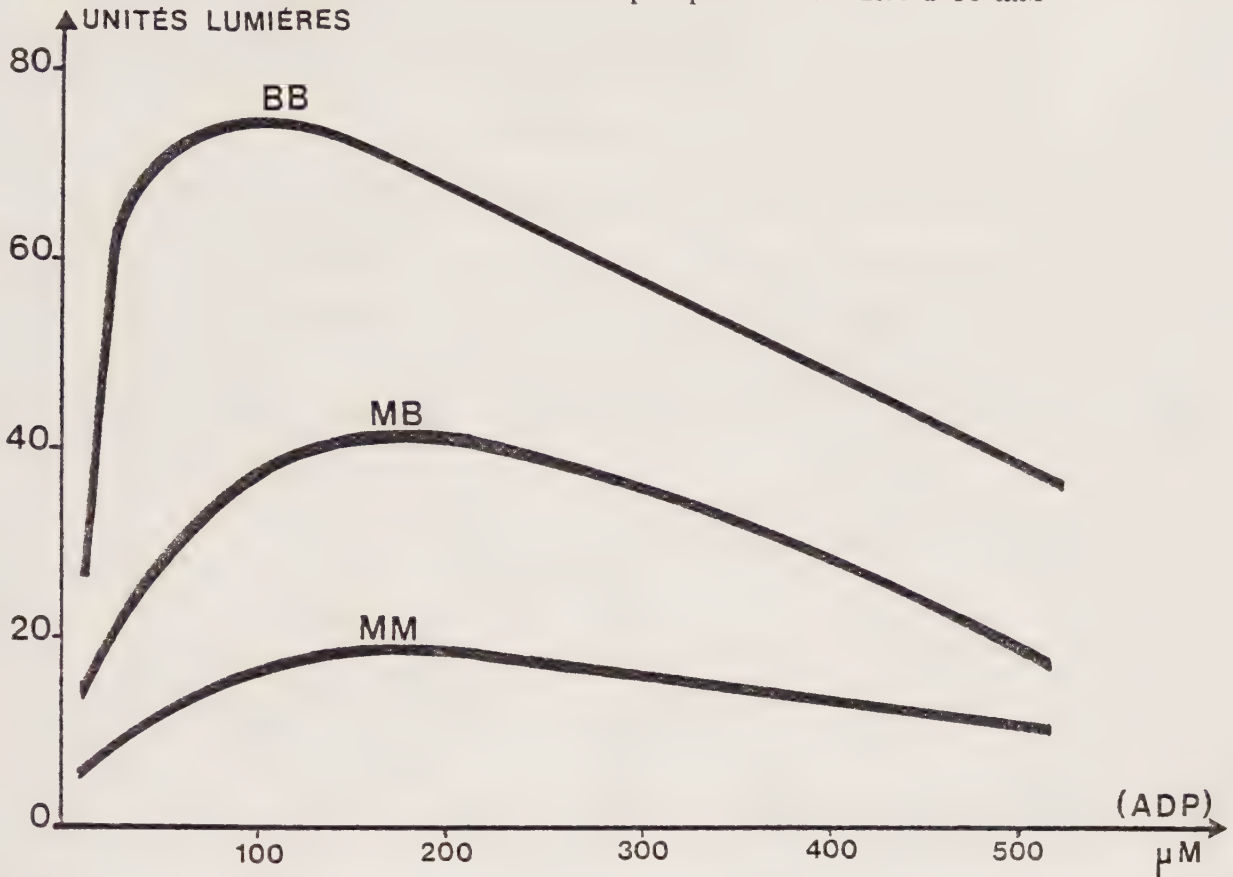
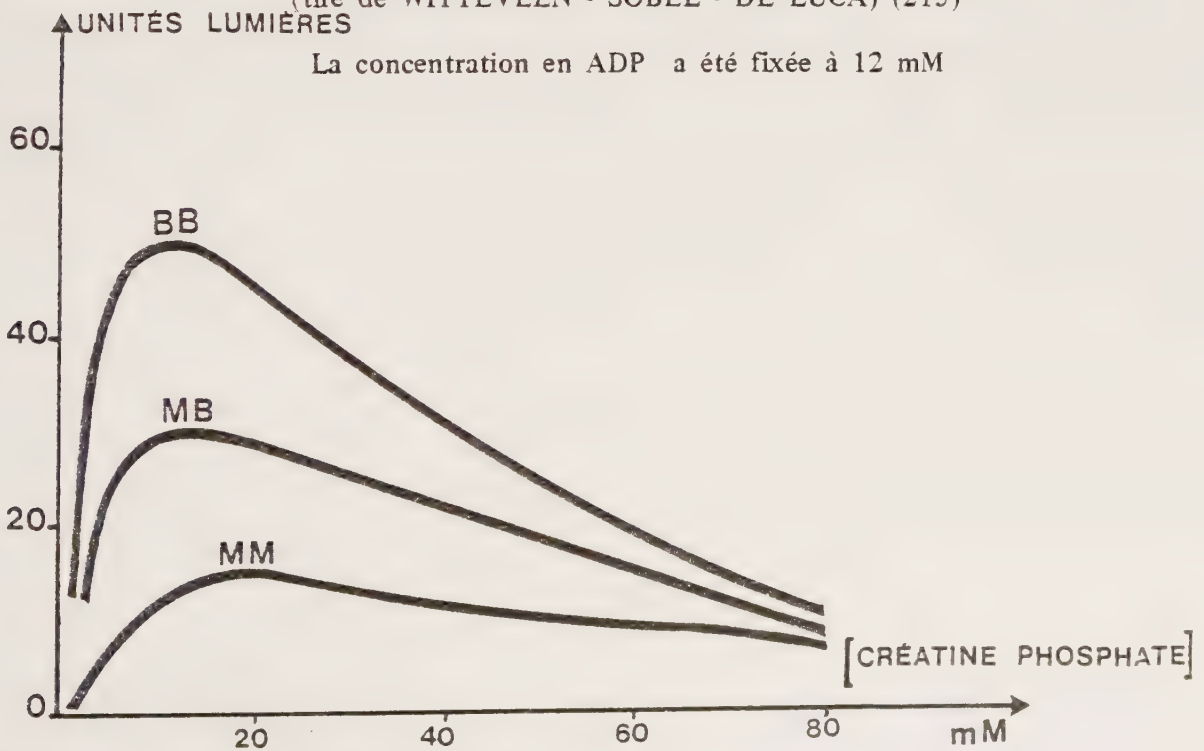


FIGURE 12 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CRÉATINE PHOSPHATE SUR L'ACTIVITE DES ISOENZYMES DE LA CK (tiré de WITTEVEEN - SOBEL - DE LUCA) (215)

La concentration en ADP a été fixée à 12 mM



III - 1.6. Conclusions.

Les conditions réactionnelles ont donc été fixées comme suit :

TABLEAU 11
CONDITIONS REACTIONNELLES DU TEST DE SCREENING

Composants	Concentration finale dans le milieu réactionnel. (mM).
ADP	0,1
CP	20
DTT	1,0
Tampon MOPS pH 7,3.	50
LL	10 g. d'organes lumineux de lucioles pour 3 litres de réactif.

Ces conditions opératoires, telles qu'elles sont proposées par ANTONIK et telles que nous les avons adoptées, constituent un optimum pour la réaction CK - LL adaptées au screening. Il s'agit en fait d'un compromis entre les conditions optimum de réaction de la CK (201) et celles de la LL - compte tenu d'une part, des spécificités de ces enzymes, et d'autre part des réactions interférantes.

III - 2. ETUDE DE LA CINETIQUE GLOBALE.

III - 2.1. Données expérimentales.

Les variations de bioluminescence au cours du temps produites, dans les conditions opératoires décrites par ANTONIK (§ 2), par des échantillons de sang apportant des activités variables de CK, ont été enregistrées (cf. figure 13).

Au cours du développement de la réaction, on observe une phase de croissance pendant laquelle la concentration d'ATP dans le milieu réactionnel augmente, car la vitesse de production de l'ATP par la CK augmente plus rapidement que sa vitesse de consommation par le système LL dont la cinétique est d'ordre 1 - puis on note un plateau - qui correspond à une période pendant laquelle la concentration est en équilibre ; enfin on observe une phase de décroissance pendant laquelle l'activité de la CK chute par défaut de substrat.

L'ATP résiduelle est alors rapidement consommé par le système LL qui reste toujours en excès.

ADDIS et ANTONIK (1) ont montré que l'intensité de l'émission lumineuse dépend plus de la concentration d'ATP disponible dans le milieu réactionnel que de l'ATP produit extemporanément par la réaction de la CK. De plus, dans un intervalle de temps donné, la luciférase ne peut transformer qu'une fraction de l'ATP disponible. Ceci peut s'expliquer par un "temps de latence" apparent de la réaction ATP/LL qui est plus long que celui de la CK. Ce temps de latence correspond au "masquage" de l'ATP dans des systèmes enzymatiques qui ne produisent pas de luminescence. Ainsi l'ATP produit par la réaction de la CK n'est pas transformé par le système LL au fur et à mesure de son apparition dans le milieu réactionnel. On peut considérer que l'ATP formé par la CK entre en partie dans un pool non réactif et que pendant l'intervalle de temps et, seule une fraction d'ATP reste disponible pour être incorporé dans le système ATP - LL. On doit pouvoir assimiler ce pool "non réactif", au complexe "inactif" évoqué précédemment (§ II - 6).

Comme l'ont montré ADDIS et ANTONIK (1), la formation de ce complexe inactif nécessite la présence de pyrophosphatase dans le milieu réactionnel. Cette enzyme est apportée par le réactif LL non purifié, mais est absente du réactif purifié. C'est à notre avis, la raison pour laquelle WITTEVEEN qui utilise un réactif LL purifié, observe, immédiatement après l'addition de CP, l'apparition de bioluminescence dont l'intensité croît de façon linéaire pendant 15 secondes. Par contre, l'apparition de la bioluminescence observée en utilisant un réactif LL non purifié suit une cinétique tout à fait différente (cf. figure 13).

En outre, dans les conditions décrites par WITTEVEEN (215) l'apparition de la bioluminescence est linéaire dans les 15 premières secondes de la phase de croissance, ce qui montre que la concentration d'ATP dans le milieu réactionnel croît linéairement. Or, la quantité d'ATP détruite dans la réaction de bioluminescence, est fonction de la concentration en ATP dans le milieu réactionnel.

Donc, l'augmentation de la bioluminescence,

- correspondant à une vitesse croissante de destruction de l'ATP (par la LL),
- résultant elle-même d'une vitesse constante de production d'ATP (par la CK),
- si l'on tient compte du fait que la vitesse relative de la LL est très supérieure à celle de la CK,

on peut affirmer que dans ces conditions (décrites par WITTEVEEN) la CK impose sa cinétique qui n'est pas d'ordre zéro.

D'autre part, si l'intensité de la bioluminescence était constante, la concentration d'ATP dans le milieu réactionnel serait constante. Donc, la quantité d'ATP détruite par unité de temps serait elle-même constante - ce qui imposerait, pour maintenir une concentration d'ATP constante dans le milieu réactionnel, une production constante d'ATP, donc une réaction de la CK d'ordre zéro.

ANTONIK (2) propose une réaction dans laquelle les concentrations en substrats sont analogues à celles utilisées par WITTEVEEN, mais le réactif LL contient de la pyrophosphatase, et la mesure de la bioluminescence est différée à 30 minutes. Si on mesure la bioluminescence à un moment où celle-ci est constante, on peut admettre que la concentration d'ATP dans le milieu réactionnel est constante, donc que le nombre de molécules d'ATP détruites, qui est égal au nombre de molécules d'ATP produites, est constant.

Ainsi en différant la mesure de la bioluminescence, les auteurs peuvent admettre que la cinétique globale est d'ordre "pseudo" zéro, car les concentrations de substrat qui ne sont pas saturantes pour la CK ne permettent pas à sa vitesse d'être maximale.

Le modèle mathématique proposé par ANTONIK et ADDIS (1), liant la bioluminescence à la cinétique de la CK suppose que la réaction de la CK est d'ordre zéro. On peut assimiler l'ordre de la réaction à un ordre zéro, uniquement quand l'activité de la CK est assez faible pour que l'on se trouve dans des conditions stationnaires de concentrations de substrats (bien que ces concentrations ne soient pas saturantes).

Nous avons enregistré les variations de bioluminescence au cours du temps dans les conditions décrites par ANTONIK (figure 12)..

Les résultats obtenus confirment notre interprétation des données d'ANTONIK.

Pour une activité enzymatique de CK basse (inférieure à 300 UI/l) on atteint lentement un plateau qui persiste au moins pendant 12 heures - on est dans les conditions stationnaires de substrat.

Pour une activité enzymatique de CK (supérieure à 900 UI/l) la bioluminescence passe par un pic rapidement atteint et décroît d'autant plus rapidement que le pic est plus élevé. Ce phénomène est dû à la décroissance rapide de la concentration en ADP.

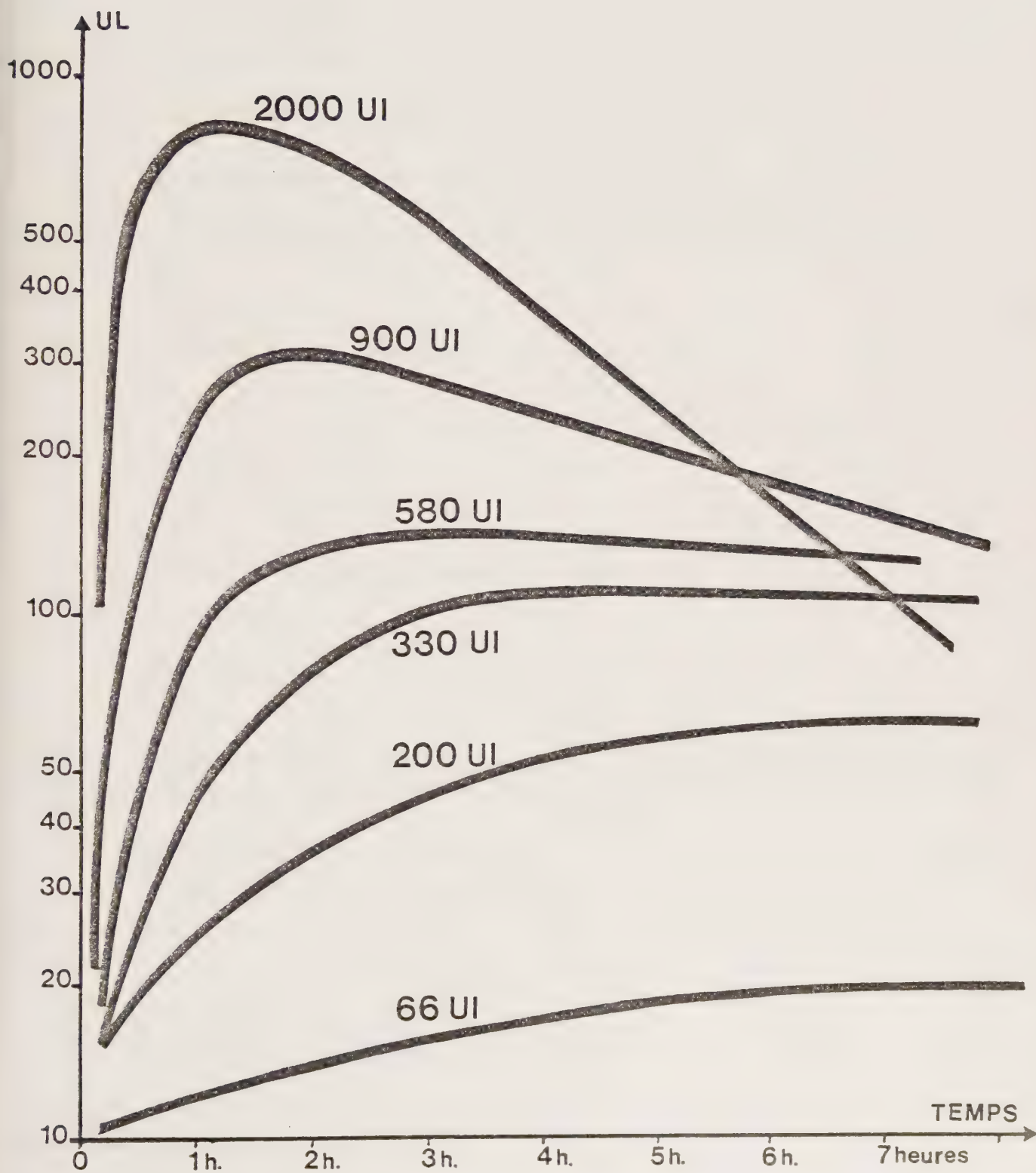
III - 2.2. Approche mathématique. (89).

Si la production d'ATP dans le milieu réactionnel au cours du temps "t" est Y, après le temps 2t, la quantité d'ATP présente dans le milieu réactionnel sera :

$$S_{2t} = Y + (Y \cdot \beta)$$

β étant la fraction d'ATP qui n'a pas été consommée au cours du temps t. En effet, au cours du temps t, il apparaît une nouvelle quantité Y qui s'ajoute à la quantité restante. $(Y \cdot \beta)$.

FIGURE 13 - EVALUATION DE LA LUMINESCENCE PRODUITE PAR DES ECHANTILLONS APPORTANT DES ACTIVITES VARIABLES DE CK



Légende : nous avons enregistré la variation de bioluminescence dans les conditions du screening.

Au cours du temps $3t$, la quantité présente sera :

$$S_{3t} = Y + (Y + Y\beta) \beta$$

Au temps nt , la quantité d'ATP dans le milieu réactionnel sera :

$$S_{nt} = Y + Y\beta + Y\beta^2 + Y\beta^3 + \dots + Y\beta^{n-1} \quad (1)$$

On peut aussi écrire :

$$\beta S_{nt} = Y\beta + Y\beta^2 + Y\beta^3 + \dots + Y\beta^n \quad (2)$$

La soustraction des égalités (1) - (2) donnera :

$$S_{nt} - \beta S_{nt} = Y - Y\beta^n$$

soit :

$$S_{nt} (1 - \beta) = Y (1 - \beta^n)$$

ou encore :

$$S_{nt} = Y \frac{(1 - \beta^n)}{(1 - \beta)}$$

Comme β est inférieur à 1 : quand $n \rightarrow \infty$
 $\beta^n \rightarrow 0$

$$\text{Donc : } S_{nt} \rightarrow S_{\infty} = \frac{Y}{1 - \beta} \rightarrow Y$$

L'intensité de la bioluminescence dépend de la cinétique de la réaction LL qui dépend elle-même du nombre de molécules d'ATP consommées par unité de temps.

Comme nous l'avons précédemment vu :

$$-\frac{d(\text{ATP})}{dt} = K(\text{ATP}) = K.S_{nt} = KY \frac{(1 - \beta^n)}{(1 - \beta)}$$

$$-\frac{d(\text{ATP})}{dt} = K.S_{nt} = K.Y (1 + \beta + \beta^2 + \dots + \beta^n)$$

III - 2.3. Interprétations.

1) Quand l'activité de la CK est faible, la LL étant en excès, on peut admettre comme

le fait ANTONIK que l'ATP est consommée au fur et à mesure de sa production, c'est-à-dire, que β est très proche de 0. Dans ce cas, l'intensité de la bioluminescence tend vers KY et le facteur "n" (dont dépend le délai de mesure) a peu d'influence.

On observe effectivement sur la courbe expérimentale établie avec un sérum contenant 66 UI/l une très faible variation de bioluminescence au cours du temps.

La variation de bioluminescence sera d'autant plus sensible que "n" est petit. On observe que la bioluminescence passe de 10 UL à 15 UL pendant les 3 premières heures et de 15 UL à 20 UL pendant les 6 heures suivantes. On peut donc admettre que, pour de faibles activités de CK, et immédiatement après l'addition de CP :

$$- \frac{d(\text{ATP})}{dt} = KY$$

l'intensité de la bioluminescence est donc fonction de Y, c'est-à-dire de l'activité de la CK qui impose alors sa cinétique à la réaction globale. Entre la 3e et la 12e heure, on observe effectivement un pseudo plateau. Dans cette période,

$$- \frac{d(\text{ATP})}{dt} = \text{constante}$$

donc :

$$KY (1 + \beta + \beta^2 + \dots + \beta^n) = \text{constante.}$$

Comme "n" varie, pour que ce facteur reste constant, il est nécessaire que :

- Y diminue, donc que la vitesse de production de l'ATP diminue,
- ou que β soit proche de 0,

Les deux phénomènes peuvent intervenir simultanément ou l'un après l'autre.

Après la 9ème heure d'incubation, la vitesse de production d'ATP devient plus faible que la vitesse de destruction. La concentration d'ATP dans le milieu réactionnel diminue et il en est de même de la bioluminescence.

L'activité de la CK diminue par défaut de substrat (nous avons montré que l'ADP est le facteur limitant de la réaction).

2) Pour des activités de CK élevées et une même activité de LL, la fraction d'ATP qui n'est pas consommée au cours du temps t, est plus importante : $\beta \rightarrow 1$, donc le facteur β^n évoluera plus rapidement.

La vitesse d'apparition de la bioluminescence :

$$- \frac{d(\text{ATP})}{dt} = KY (1 + \beta + \beta^2 + \dots + \beta^n)$$

sera beaucoup plus rapide.

Par exemple, si l'activité de CK est faible, $\beta = 0,2$
 si l'activité de CK est forte, $\beta = 0,8$

Lorsque la mesure est faible à la 3ème minute, si l'on considère que l'unité de temps est la minute, on aura :

CK faible : $KY (1 + 0,2 + 0,04 + 0,0016) = KY \times 1,24$

CK forte : $KY (1 + 0,8 + 0,64 + 0,4096) = KY \times 2,84.$

Les courbes expérimentales confirment que l'apparition de la bioluminescence est d'autant plus rapide que l'activité de la CK est forte.

De même pour des activités de CK élevées, la consommation d'ATP sera plus rapide et la chute de la bioluminescence sera plus précoce et plus rapide car elle partait d'un niveau plus élevé.

III - 2.4. Conclusions :

Il est donc indispensable de mesurer l'intensité de la bioluminescence dans des conditions opératoires telle que la valeur mesurée dépende essentiellement de l'activité de la CK. Il faudrait donc :

1) que $\beta \rightarrow 0$, c'est-à-dire que le système luciférine luciférase soit en large excès sur la CK - pour des activités très fortes rencontrées dans les sangs de myopathes $\beta \rightarrow 1$. Dans ces conditions, il faut choisir un temps d'incubation suffisamment court pour que β^n reste proche de β .

(le rapport $\frac{1 - \beta^n}{1 - \beta}$ resterait proche de 1 et constant)

Mais si le temps d'incubation est trop court, on observe une perte de sensibilité du système pour les valeurs de CK intermédiaires ou faibles.

Le délai de mesure a été choisi à la 30e minute après l'addition de la créatine phosphate.

2) que $Y = cte$ c'est-à-dire : les concentrations de substrats ADP et CP sont saturantes. Nous avons vu que l'ADP est le facteur limitant mais que sa concentration de 10^{-4} M dans le milieu réactionnel est imposée par le bruit de fond dû à la présence de myokinase.

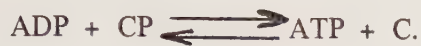
3) La standardisation de l'activité de la luciférase soit possible. En effet, si l'activité de la luciférase est trop faible, la bioluminescence mesurée diminue. Il est donc indispensable comme l'ont montré ANTONIK, de comparer les valeurs de bioluminescence obtenues avec le système LL aux valeurs mesurées par la méthode d'OLIVER et ROSALKI (147) et de réaliser cette corrélation pour chaque lot de réactifs.

III - 3. FIABILITE DE LA REACTION.

III - 3.1. Spécificité — Travaux personnels.

Après le premier temps de la réaction, l'ATP préexistante dans l'échantillon et produite "in situ" a quasiment disparu et la bioluminescence résiduelle n'est que d'environ 4 UL.

Le deuxième temps de la réaction est initié par l'addition du réactif B qui conduit à une concentration finale de 20 mM de CP dans le milieu réactionnel. Le CP étant le substrat spécifique de la CK, la bioluminescence produite est donc attribuée à l'ATP formée dans la réaction :



Le deuxième temps de la réaction ne dépend donc, théoriquement, que de l'activité de la CK de l'échantillon à analyser. Nous nous sommes assurés que le réactif A ne contient pas de CK (un blanc ne contenant pas l'échantillon est conduit dans les mêmes conditions opératoires que la réaction).

De plus nous avons vérifié que les globules rouges n'introduisent pas de production parasite d'ATP à partir de CP.

— Protocole :

Dans des tubes calibrés, nous avons ajouté :

- . réactif A : 200 μl ,
- . globules rouges prélevés sur héparine lavés 5 fois au sérum physiologique, hémolysés et repris à 50 % dans une solution de sérum albumine à 70 g/l : 4 μl ,
- . Nous avons laissé les tubes incuber 20 heures à 24°C,
- . la bioluminescence a été mesurée (2 à 3 UL) avant et 10 minutes et 30 minutes après l'addition de 50 μl de réactif B.

— Résultat :

TABLEAU 12

Nombre de mesures réalisées.	Variations de la bioluminescence (UL) après 10 min.	Variations de la bioluminescence (UL) après 30 min.
30	$\bar{X} = 1,2$ (0,6 à 1,7)	$\bar{X} = 1,5$ (1 à 2)

Spécificité de la CP comme substrat spécifique de la CK.

– *Interprétation :*

La variation de bioluminescence observée (1,2 UL) pourrait être interprétée comme une activité de la CK dans les globules rouges, ou la présence d'une contamination. En fait nous avons interprété cette augmentation comme un "effet de dilution" car :

– 30 min. après l'addition du réactif B, la bioluminescence mesurée n'a quasiment pas variée par rapport à la bioluminescence mesurée à la 10ème minute (0,3 UL), ce qui est négligeable compte tenu de l'instabilité du zéro de l'appareil (1 UL/heure).

– une deuxième série de tubes a été traitée dans des conditions semblables, mais en remplaçant les 50 μ l de réactif B par 50 μ l de tampon MOPS. La variation d'absorbance est du même ordre. Donc l'activité de la créatine kinase dans les globules rouges, si elle existe, n'est pas suffisamment importante pour être mise en évidence par cette technique.

Donc la bioluminescence mesurée après l'addition de CP ne dépend que de l'activité de la CK apportée par le sérum dans l'échantillon.

III - 3.2. Linéarité.

III - 3.2.1. Données bibliographiques :

HWANG (89) en utilisant des solutions d'enzymes obtenues par dilution d'une solution mère à 2100 UI, obtient une relation linéaire entre l'activité théorique comprise entre 100 UI et 1000 UI et l'intensité de la bioluminescence - mesurée sur les mêmes solutions - 3 minutes après l'addition de CP.

LEE et al. (107) obtiennent dans les conditions précédemment décrites une bonne linéarité entre la bioluminescence et des quantités d'enzymes purifiées variant de 17 à 127 μ g ajoutées dans le milieu réactionnel.

III - 3.2.2. Travail personnel :

– *Protocole opératoire :*

Nous avons dilué au 1/2 avec des globules rouges O lavés, un sérum dont l'activité a été évaluée à 900 UI.

L'échantillon ainsi obtenu a été à nouveau dilué au 1/2, au 1/4, et au 1/8 dans du sérum physiologique - et chaque dilution de la CK a été mesurée d'une part selon la méthode "ANTONIK", et d'autre part, selon la méthode d'OLIVER et ROSALKI. (158).

– Résultats :

TABLEAU 13

Méthode d'OLIVER et ROSALKI.	Méthode d'ANTONIK	Méthode SFBC UL (moyenne de 10 mesures).
I	900	140
1/2	630	86
1/4	310	33
1/8	120	16

Linéarité de la réaction couplée CK - ATP - LL.

On peut en conclure que, dans les conditions opératoires proposées, la linéarité est satisfaisante.

III - 3.3. Mise en évidence du phénomène de “QUENCHING” – Travaux personnels.

Le phénomène de “Quenching” est un parasite classique des réactions de bioluminescence ; nous avons évalué son incidence sur la réaction globale en mesurant la bioluminescence produite par des échantillons de sérum et par des échantillons de sérum dilués au 1/2 dans des globules rouges lavés. puis hémolysés.

Les prélèvements ont été préalablement déposés sur un support papier, et le protocole utilisé est celui d'ANTONIK.

Les moyennes des valeurs obtenues sur 10 mesures sont :

TABLEAU 14

EVALUATION DU “QUENCHING” DE LA BIOLUMINESCENCE
PAR L'HEMOGLOBINE.

A Sérum pur (UL)	B Sérum dilué au 1/2 dans des G.R. (UL)	% d'inhibition dûe au quenching $\frac{A - B}{A} \times 100 - 50 \%$
54	21	- 11
180	64	- 14
630	260	- 8
1200	540	- 4

Le facteur de Quenching n'est pas proportionnel à la bioluminescence et passe par un maximum pour une activité de l'ordre de 200 UL.

Mais en pratique cette valeur de Quenching, qui ne dépasse pas 15 % n'est pas gênante pour le screening, la variation pathologique mesurée étant 3 à 50 fois la valeur la plus fréquente (12UL).

III - 3.4. Correspondance entre UL et UI (Méthode d'OLIVER ROSALKI).

III - 3.4.1. Données bibliographiques (89).

HWANG établit une corrélation entre l'activité de la CK mesurée par la méthode de ROSALKI (169) et l'intensité de la bioluminescence, mais en se plaçant dans des conditions très particulières :

- Les solutions étudiées sont préparées par dilution d'une solution mère,
- L'auteur ne précise pas si l'échantillon est introduit dans le milieu réactionnel sous la forme d'une solution ou d'une pastille de papier,
- Il utilise une double échelle, Log - Log pour obtenir un coefficient de corrélation de 0,9458.
- Les mesures de bioluminescence sont réalisées 3 minutes exactement après l'addition du réactif B (délai de mesure différent de celui préconisé par ANTONIK).

BRITT et ANTONIK (23) ont travaillé dans des conditions semblables aux nôtres, mais les intensités de bioluminescence sont mesurées après 120 minutes d'incubation avec le réactif B. Les coefficients de corrélation obtenus par ces auteurs sont de l'ordre de 0,750 pour des activités de CK inférieures à 200 UI.

III - 3.4.2. Travaux personnels.

Nous avons dilué des sérums d'activité donnée au 1/2 dans des globules rouges 0 lavés dans du sérum physiologique. Nous avons placé une partie du sang ainsi reconstitué sur du papier support et l'activité enzymatique a été évaluée sur l'autre partie, 48 heures après par la méthode d'OLIVER ROSALKI (158) (les sérums ont été conservés à + 4° C). Les mesures de bioluminescences ont été réalisées dans les conditions décrites par ANTONIK. Les moyennes sur 20 mesures sont portées dans le tableau 15.

TABLEAU 15

CORRESPONDANCE ENTRE L'ACTIVITE DE LA CK DETERMINEE
SELON LA METHODE D'OLIVER ET ROSALKI (158)
ET SELON LA METHODE D'ANTONIK (2).

UI (1 mesure)	UL (10 mesures)
66	12
200	18
330	29
580	53
900	140
2000	700

Il faut souligner qu'une activité sérique de 330 UI correspond à environ 30 UL - soit le seuil de positivité que nous nous sommes fixé pour le screening.

III - 3.5. Précision.

Il nous a paru utile d'évaluer d'une part la répétabilité du test global, et d'autre part la répétabilité de la réaction.

III - 3.5.1. Répétabilité du test global.

Nous avons réalisé plusieurs poinçonnages de plusieurs taches de sang prélevées dans les conditions décrites, et nous les avons traitées selon la technique proposée par ANTONIK. Les résultats sont consignés dans le tableau 16.

TABLEAU 16
REPETABILITE DU TEST GLOBAL DE SCREENING
(Poinçonnage et réaction)

Moyenne de la bioluminescence mesurée 30 min. après addition de CP (UL).	Nombre de mesures	Valeurs extrêmes (UL)	Ecart type (UL)	CV (%)
8,55	20	6 - 11	1,47	17,2
11,65	20	10 - 13	0,81	7
18,60	20	15 - 26	2,58	13,9
25,25	20	23 - 30	2,45	9,7
32,95	20	27 - 45	4,77	14,5
50,75	20	38 - 71	10,5	20,7
75,65	20	52 - 100	14,56	19,3
177,40	20	103 - 211	43,6	24,6
386,84	20	250 - 690	107	27,8
801,75	20	540 - 1140	202,5	25,3

III - 3.5.2. Répétabilité de la réaction.

Les mêmes échantillons de sang sont dilués au 1/50e dans le réactif A et 204 μ l de chacune des dilutions, sont introduites dans 20 tubes. Ainsi dans chaque tube, on retrouve 4 μ l de sang et 200 μ l de réactif A. (2 échantillons n'ont pas été traités car ils étaient en quantité insuffisante).

Après 20 heures d'incubation, nous avons rajouté 50 μ l de réactif B et nous avons mesuré la bioluminescence après 30 minutes. (tableau 17).

TABLEAU 17
REPETABILITE DE LA REACTION ISOLEE

Moyenne des bioluminescences mesurées 30 min. après addition du réactif B (UL).	Nombre de valeurs	Valeurs extrêmes (UL)	Ecart-type (UL)	CV (%)
7,65	20	7,5 - 8	0,85	11,1
11,83	20	10,5 - 12,5	1,99	16,8
38,59	20	36 - 41	1,64	4,2
54,75	20	50 - 58	2,83	5,1
86,17	20	80 - 92	4,21	4,8
208	20	203 - 218	5,05	2,40
431	20	400 - 470	20,33	4,7
1012	20	900 - 1220	101,74	10

III - 3.6. Recherche de contaminants éventuels inhibiteurs des réactions – Travaux personnels.

Les principales contaminations peuvent, dans les conditions normales de la réalisation du test, être introduites au moment du prélèvement par un antiseptique cutané : l'alcool iodé, l'éther, l'alcoogermine ou l'alcool à 95°. Ces antiseptiques locaux ont été testés comme contaminants dans deux séries de prélèvements réalisés sur le même malade. (*)

- Série A : la peau est désinfectée dans des conditions normales.
- Série B : l'antiseptique est dilué au 1/100e dans le sang prélevé au pli du coude avant d'être déposé sur le support papier.

Les résultats sont portés dans le tableau 18.

(*) Nous remercions le Docteur LACHANAT et le Personnel de la Fondation RICHARD de son aide.

TABLEAU 18

RECHERCHE D'ANTISEPTIQUES LOCAUX INHIBITEURS
DE LA REACTION DE SCREENING PAR CONTAMINATION DU PRELEVEMENT.

Antiseptiques	Série de prélèvement A (2 mesures).	Série de prélèvement B (2 mesures).
Témoin (absence d'antiseptique).	920 - 900	980 - 920
Alcool Iodé.	900 - 920	680 - 780
Ether.	850 - 550	860 - 875
Alcoogerme	820 - 800	1050 - 870
Alcool à 95°	800 - 880	940 - 950

En conclusion, si une inhibition de l'activité enzymatique existe, celle-ci n'est pas suffisante pour rendre négatif un test positif.

III - 3.7. Conservation des Echantillons – Travaux personnels.

Des échantillons de sang ont été prélevés sur des enfants myopathes (*) (à différents stades d'évolution).

Les cartes ont été conservées à la température du laboratoire et traitées le lendemain, quinze jours et trente jours après le prélèvement.

Les valeurs des bioluminescences mesurées dans les conditions habituelles, ont été portées dans le tableau 19.

TABLEAU 19

ETUDE DE LA CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Intensité de la bioluminescence le lendemain du pré- lèvement (UL)	Intensité de la bioluminescence 15 jours après le prélèvement (UL)	Intensité de la bioluminescence 1 mois après le prélèvement (UL)
100	56	58
170	120	129
10	8	11
10	8	11
1260	1050	930
1260	1140	900
450	420	480
520	250	400
295	330	400
290	156	273
280	171	294
130	156	144
1140	840	520
270	180	282
52	33	57
49	38	45
52	42	46
66	70	60
95	90	105
93	96	135
1260	1080	990
1230	1020	840

Une baisse d'environ 20 % pour les valeurs supérieures à 1000 UL est observée entre le 1er et le 15ème jour de la conservation.

Pour des valeurs moyennes (500 UL), la diminution observée sur 30 jours est d'environ 20 %. Certains chiffres, plus élevés au 30e jour, peuvent s'expliquer par l'imprécision du poinçonnage.

Enfin, pour les valeurs basses (100 UL), la diminution de l'activité est négligeable. On peut donc conclure que la conservation des échantillons altère les fortes activités (qui demeurent cependant au dessus du seuil de positivité), mais ne modifie que de peu les résultats les plus faibles.

Ces paragraphes sont en accord avec les données rapportées dans le paragraphe I.3.

III - 3.8. Conclusions.

La méthode décrite présente par ses caractéristiques de :

- spécificité,
- linéarité,
- une fiabilité tout à fait compatible à son utilisation dans un screening de masse.

Il faut noter que, ni le quenching, ni le mode de distribution des échantillons à doser (poinçonnage du papier), n'altèrent sensiblement la fiabilité de cette réaction.

La qualité du test global dépend aussi du prélèvement et des conditions de séchage et de transport des échantillons.

Nous avons montré que les antiseptiques usuels utilisés n'interviennent pas comme inhibiteurs de la réaction. Il faut toujours garder à l'esprit qu'un séchage par la chaleur (radiateur, sèche-cheveux, étuve) peut altérer notablement l'activité enzymatique de l'échantillon et être à l'origine de faux-négatifs.

★○★

CHAPITRE IV.

*

RESULTATS

Une valeur de bioluminescence de 30 UL mesurée 30 minutes après l'addition du réactif B, correspond à une activité de 3 à 400 UI (cf. § III - 3.4.).

Or, le taux moyen de CK chez les nouveau-nés myopathes est de 20 à 50 fois la valeur la plus fréquente, soit 1000 à 5000 UI (46.65). Par conséquent le seuil de 30 UL correspond à une activité 2,5 fois plus faible que la plus faible activité pouvant être rencontrée chez un myopathe.

C'est donc sur ce critère que le seuil de positivité a été fixé à 30 UL.

IV - 1. RESULTATS DU DEPISTAGE NEONATAL SYSTEMATIQUE DE LA DMD. (du 18 Juin 1975 au 1er. Avril 1978). (figure n° 14).

Ils sont consignés dans le tableau 20.

- 109.100 prélèvements ont été traités entre le 18 Juin 1975 et le 1er. Avril 1978 par la méthode décrite (chap. I.).
- 200 tests ont conduit à suspecter un garçon myopathe ou une fille transmettrice.
- 156 tests ont été contrôlés, permettant le diagnostic définitif de 9 myopathes.

De plus un test de dépistage effectué pour un malade dont le diagnostic de DMD avait été déjà établi en-dehors de notre organisation, s'est révélé positif.

○

FIG. 14 ENREGISTREMENT DES INTENSITES DE BIOLUMINESCENCE DANS LES
CONDITIONS OPERATOIRES DU SCREENING

100
80
60
40
20
0

100
80
60
40
20
0

N° 5401.2

2

1

24

23

Scale 3

Scale 2

Scale 1

27.0.17. 27.0.18. 27.0.19. 27.0.20. 27.0.21. 27.0.22. 27.0.23. 27.0.24. 27.0.25. 27.0.26. 27.0.27. 27.0.28. 27.0.29. 27.0.30. 27.0.31. 27.0.32. 27.0.33. 27.0.34. 27.0.35. 27.0.36. 27.0.37. 27.0.38. 27.0.39. 27.0.40. 27.0.41. 27.0.42. 27.0.43. 27.0.44. 27.0.45. 27.0.46. 27.0.47. 27.0.48. 27.0.49. 27.0.50. 27.0.51. 27.0.52. 27.0.53. 27.0.54. 27.0.55. 27.0.56. 27.0.57. 27.0.58. 27.0.59. 27.0.60. 27.0.61. 27.0.62. 27.0.63. 27.0.64. 27.0.65. 27.0.66. 27.0.67. 27.0.68. 27.0.69. 27.0.70. 27.0.71. 27.0.72. 27.0.73. 27.0.74. 27.0.75. 27.0.76. 27.0.77. 27.0.78. 27.0.79. 27.0.80. 27.0.81. 27.0.82. 27.0.83. 27.0.84. 27.0.85. 27.0.86. 27.0.87. 27.0.88. 27.0.89. 27.0.90. 27.0.91. 27.0.92. 27.0.93. 27.0.94. 27.0.95. 27.0.96. 27.0.97. 27.0.98. 27.0.99. 27.0.100.

27.0.17. 27.0.18. 27.0.19. 27.0.20. 27.0.21. 27.0.22. 27.0.23. 27.0.24. 27.0.25. 27.0.26. 27.0.27. 27.0.28. 27.0.29. 27.0.30. 27.0.31. 27.0.32. 27.0.33. 27.0.34. 27.0.35. 27.0.36. 27.0.37. 27.0.38. 27.0.39. 27.0.40. 27.0.41. 27.0.42. 27.0.43. 27.0.44. 27.0.45. 27.0.46. 27.0.47. 27.0.48. 27.0.49. 27.0.50. 27.0.51. 27.0.52. 27.0.53. 27.0.54. 27.0.55. 27.0.56. 27.0.57. 27.0.58. 27.0.59. 27.0.60. 27.0.61. 27.0.62. 27.0.63. 27.0.64. 27.0.65. 27.0.66. 27.0.67. 27.0.68. 27.0.69. 27.0.70. 27.0.71. 27.0.72. 27.0.73. 27.0.74. 27.0.75. 27.0.76. 27.0.77. 27.0.78. 27.0.79. 27.0.80. 27.0.81. 27.0.82. 27.0.83. 27.0.84. 27.0.85. 27.0.86. 27.0.87. 27.0.88. 27.0.89. 27.0.90. 27.0.91. 27.0.92. 27.0.93. 27.0.94. 27.0.95. 27.0.96. 27.0.97. 27.0.98. 27.0.99. 27.0.100.

24

23

IV - 2. SUITES DONNEES AUX TESTS POSITIFS.

Le terme "positif" ne préjuge pas du diagnostic final et ne s'applique qu'au chiffre supérieur au seuil de positivité.

Lorsqu'un résultat positif a été obtenu sur un prélèvement déterminé, un nouveau test identique est pratiqué en double sur le même prélèvement, et la lecture est effectuée à la 30e et 60e minute après l'addition du réactif B.

IV - 2.1. Si le résultat de la première lecture ou celui des deux lectures est supérieur à 30 UL, un deuxième prélèvement est demandé par l'intermédiaire du secrétariat de l'A.R.D.E.M.M.E.

— Si la famille habite près de l'agglomération lyonnaise, elle est invitée à se rendre au service de génétique de l'Hôtel Dieu où un prélèvement sur tube est réalisé, en vue de l'évaluation de l'activité de la CK dans le sérum. Les examens sont adressés au laboratoire d'enzymologie de l'hôpital Debrousse (Mlle. MATHIEU). Les mesures de l'activité de la CK. sont réalisées par la méthode d'OLIVER et ROSALKI modifiée (158).

— Lorsque la famille habite trop loin de Lyon ou ne peut se rendre au service de génétique de l'Hôtel Dieu, le secrétariat de l'A.R.D.E.M.M.E. demande à la maternité de convoquer l'enfant pour réaliser le prélèvement à la maternité. Le secrétariat de l'A.R.D.E.M.M.E. fait part au médecin traitant, à la famille et à la DASS, de cette convocation.

Lors de difficultés, l'A.R.D.E.M.M.E. fait appel à la DASS du département.

IV - 2.2. Si la positivité du test a été confirmée lors de l'examen précédent, la famille du sujet, est convoquée à une consultation de génétique au cours de laquelle une enquête familiale est entreprise, et un deuxième prélèvement de sang en vue de l'évaluation du taux de CK dans le sérum est pratiqué chez les enfants (frères, soeurs et malades suspects) ainsi que chez les deux parents.

IV - 2.3. D'après le résultat obtenu, le généticien propose une hospitalisation pour un bilan plus complet (électromyographie, biopsie, ...).

Lorsque la famille n'a pas répondu à trois convocations successives les recherches sont abandonnées si le taux obtenu par le test de screening est inférieur à 80 UL chez les garçons et inférieur à 50 UL chez les filles. C'est ainsi qu'il a fallu quatre mois de recherche assidue pour retrouver la trace d'un enfant pour lequel le taux du test de screening a montré 610 UL et dont le diagnostic de DMD a été confirmé.

On notera que le chiffre de 200 tests dits "positifs" ne représentent en fait que 2 ‰ de la totalité des tests pratiqués.

En fait ce faible pourcentage recouvre à la fois les enfants de sexe féminin et masculin. Or il n'existe pas pour l'heure de méthode permettant de classer avec certitude à la naissance un enfant dans le groupe des conductrices "sûres" (définie carrière). (161).

Il convient dans la discussion des résultats de distinguer le cas des garçons et celui des filles. Il n'en reste pas moins qu'il est difficile de retrouver les causes d'élévation de la CK chez le nouveau-né.

L'hypoxie et le traumatisme à la naissance ont été avancés (79, 165) comme les causes les plus fréquentes des élévations transitoires des taux de CK chez le nouveau-né.

○

IV - 3. ETUDE DES CAS CONFIRMES.

Le tableau 21 regroupe les résultats en Unités Lumières du test de screening, ainsi que les résultats des autres moyens de diagnostic.

Le dépistage néonatal des 9 garçons myopathes a permis de recenser 30 conductrices éventuelles. Chez deux d'entre elles le diagnostic a été confirmé et les autres ont des taux de CK anormaux.

Notons que dans la famille "A.L.", le dépistage néonatal systématique de la DMD, s'il avait existé en 1972 aurait permis éventuellement d'éviter la naissance de deux enfants myopathes.

○

TABLEAU 20
RESULTATS DE 33 MOIS DE DEPISTAGE NEO-NATAL SYSTEMATIQUE DE LA DMD.

ANNEES	TESTS EFFECTUES		TESTS POSITIFS		MYOPATHIES CONFIRMES		
	Nombre G + F	% des naissances G + F	Nombre G F	°/°° des tests effectués G + F	G malade F transmet- trice.	% des tests positifs contrôlés. G + F	
18 Juin 1975 31 Déc. 1975	21.835	98	14 dont 2 NC	10	0	0	
2 Janv. 1976 31 Déc. 1976	38.314	98	20 dont 2 NC	19 dont 3 NC	5	0	36
1er Janv. 1977 31 Déc. 1977	39.157	98	62 dont 9 NC	55	3	0	17
1er Janv. 1978 1er Avril 1978	9.800	98	11 dont 5 NC	19 NC	1	1 ?	16
BILAN	109.106		107	93	9	1 ?	

NC : test positif non contrôlé.

TABLEAU 21
CONFIRMATION DU DIAGNOSTIC DE MYOPATHIE CHEZ 9 ENFANTS
RECHERCHE DES CONDUCTRICES APPARENTÉES ET CONSEIL GENETIQUE.

	CPK naissance UL	1er contrôle UI	2è. contrôle UI	3e contrôle UI	BIOPSIE
G.L. né 19.3.76	2.4.76 1200	25.5.76 2770	23.9.76 3700		2.4.78
M. JC. né 8.6.76	29.6.76 1350	30.7.76 2200	23.11.76 1700	24.1.77 1450	
R.G. né 18.10.76	23.9.76 700	15.10.76 740	25.11.76 1430	26.1.77 1370	+++
HR. K. né 10.10.76	15.10.76 610	17.2.77 1350	13.6.77 1520	28.2.78 1125	
G.M. né 14.10.76	17.12.76 195	15.12.76 1415	31.3.77. 4032	mai 77 2270	+++
C.S. né 3.12.76	14.1.77 1444	13.4.77 1500	16.6.77 1240	12.9.77 1520	++
P.F. né 22.1.77	16.2.77 1200	7.3.77 780	10.5.77 830	22.8.77 1240	
C.S. né 28.8.77	16.9.77 285	18.10.77 910	19.12.77 1240		
A.L. né 19.1.78	1.2.78 sup. 800	sup. 1000			
Cas suspects					
K.K. né 5.10.77	120	157	390	450	
G. Delphine né 2.9.77	220	620			
G.Z. né 11.3.78	700	52			

Electromyogramme.	Conductrices éventuelles CK.	Conductrices	Conseil Génétique
	Carole (s) 29 UI Mère 19 UI. Michelle (T) Juliette (T) Jacqueline (T)		Les quatre couples ne veulent plus d'enfants. Contraception chimique.
	Danielle (M) 19 - 23 UI Sylviane (S) Josette (T) 2 (GT)		Départ à Marseille (à suivre) Contraception chimique.
++++	Rose (T) 12 - 8 UI Marie (T) 15 - 8 UI Kathy (T) 10 UI Salvatrice (M) 12,18,26, 10 UI.	Salvatrice Mère EMG++++ (X2) Biopsie négative	Mère conductrice (EMG) Contraceptif Veut un autre garçon
	Fadila (M) 45 UI Aïcha (S) 33 UI, Nassessa (S) Louisa (S) Habra (S) 54 UI Absia (T)		Mutation nouvelle ? Pas de contraception
+	Mère 286 UI - 25 UI M. Claude (T) Christiane (T)		Suivi service Professeur LAURAS - St. Etienne -
+	Béatrice (S) 330 - 42 UI Myriam (M) 370 - 340 UI Irma (T) 12 UI M. Thérèse (T)		Ne veut plus d'enfants Contraception chimique.
+	Emmanuelle (S) 25 UI Anne Marie (M) 153 - UI 300 UI - 250 UI		Ne veut plus d'enfants Contraception chimique
++			Suivi service Pr. BEAUDOING - Grenoble - un cousin germain : myopathe.
	Andrée (T) → myopathe 1972 Mme. C. → myopathe Danielle (T)	Mère + 2 tantes	mère conductrice (généalogie) Suivie par le Docteur ROSENBERG.

M : Mère de l'enfant dépisté
T : Tante de l'enfant dépisté
S : Soeur de l'enfant dépisté.

DISCUSSION

Lorsqu'en 1975, ZELLWEGER et ANTONIK, proposèrent un test de dépistage systématique néonatal de la myopathie de DUCHENNE, la question qui se pose alors fut :

"Est-il justifié, sur le plan éthique, médical, social et économique, de dépister une maladie, pour laquelle il n'existe pas de traitement ?"

Cette interrogation en pose implicitement une autre ?

"Ce dépistage est-il possible techniquement avec toutes les garanties nécessaires ?"

Nous avons tenté, dans ce travail que nous ont confié les Professeurs J. COTTE, J.M. ROBERT et C. COLLOMBEL, et qui fait en partie l'objet de la thèse que nous soumettons aujourd'hui, de répondre à cette deuxième interrogation, en résolvant une première difficulté, liée à la fiabilité du test.

Par la suite, en analysant les résultats obtenus depuis 1975 dans la région lyonnaise par le premier programme mondial de dépistage systématique de la myopathie, nous avons apporté quelques éléments positifs de réponse à la première question, beaucoup plus complexe.

Le test de dépistage que nous avons étudié doit être analysé dans son principe et dans sa réalisation.

PRINCIPE

Le principe du test est basé sur l'augmentation constante et spécifique de l'activité de la Créatine Kinase dans le sang des nouveaux-nés myopathes.

— Cette donnée peut être mise en question, car elle n'est appuyée par aucune preuve directe. La série de DEMOS (8 cas) ne permet pas de conclure. Cependant, il semble admis que la myopathie de DUCHENNE, maladie génétique liée au chromosome X se développe déjà in utero.

. EMERY et GREGOR (67) retrouvent des anomalies à l'examen histologique d'un tissu de muscle prélevé chez un fœtus à risque — bien que selon WEBB (213), des anomalies analogues peuvent se rencontrer chez un fœtus normal, il semble que la culture du muscle de fœtus myopathe puisse servir de matériel d'étude de la pathogénie de la DMD.

. STENGEL-RUTOWSKI et al. (191), retrouvent dans le sang placentaire prélevé par foetoscopie chez un fœtus de 16 semaines, un taux de CK 4 fois plus élevé (540 UI) que le plus fort taux retrouvé dans une population de 25 fœtus témoins. La biopsie musculaire pratiquée sur le produit d'avortement a confirmé la myopathie.

. DUBOWITZ et al. (63) a prélevé chez une femme à risque le sang d'un fœtus à la 16e semaine. L'évaluation du taux de CK par la technique d'ANTONIK, sur support de papier, révélant un chiffre normal, la grossesse a été poursuivie et un garçon normal est né.

. MAHONEY et al. (126) réalise une série "témoin" sur 16 fœtus normaux. Les valeurs de CK du sang fœtal prélevé par foetoscopie, varient de 0 à 150 UI. Un fœtus chez une femme à risque montrait une activité de 540 UI. La biopsie musculaire pratiquée sur le produit d'avortement a confirmé la DMD, alors qu'un fœtus à risque, chez lequel le taux de CK a été trouvé à 96 UI a donné naissance à un enfant en bonne santé.

Ces quatre observations qui ont toutes été publiées après le début de notre programme de screening ont confirmé que le taux de CK est élevé chez le fœtus malade.

— L'élévation du taux de CK, existant in utero, il paraît évident qu'elle se manifeste encore à la naissance, puisqu'on la retrouve dans les premiers mois de la vie.

Cependant cette élévation entraîne-t-elle des taux significativement distincts des valeurs normales ?

Cette variable biologique est-elle spécifique ?

D'après les résultats de DEMOS (48) et d'EBASHI (65), les valeurs de la CK sérique sont 20 à 100 fois plus élevées chez le nouveau-né myopathe que chez le nouveau-né normal. De plus, en-dehors de la DMD, les causes d'augmentation sérique de la CK chez le nouveau-né sont multiples mais peu fréquentes : il s'agit essentiellement :

- . de l'hypoxie (165),
- . de troubles cérébraux (28),
- . de convulsions (74),
- . de polymyosites (26),
- . de myosites virales,
- . de l'hypothyroïdie (78, 91),
- . de prises médicamenteuses (131),
- . ou bien éventuellement, d'autres myopathies (86, 152, 188).

On peut donc admettre que la CK sérique, représente un paramètre biologique dont la mesure d'activité permet de distinguer les malades dans la population normale des nouveaux-nés. Le test, dans son principe est donc adapté au dépistage néo-natal systématique de la myopathie de DUCHENNE.

REALISATION PRATIQUE DU TEST.

— Le prélèvement est simple, bon marché et facile à mettre en oeuvre. Cependant, comme nous l'avons précédemment montré (§ III - 3.5.), la précision de l'ensemble de l'examen, dépend en grande partie de la qualité du prélèvement qui est responsable en partie des causes d'erreurs (faux-positifs et faux-négatifs). Les inhibiteurs éventuels de la réaction enzymatique, qui peuvent être apportés par les antiseptiques locaux usuels, ont été étudiés, et mis hors de cause si ils sont utilisés dans des conditions normales.

— Le transport est très facile (par la poste) et nous avons contrôlé que les activités enzymatiques de la CK se conservent pendant 15 jours dans des conditions normales. La diminution d'activité la plus forte (20 %) s'observe sur des taux élevés qui restent cependant au-dessus du seuil de positivité.

L'absence de purification des réactifs utilisés, et les conditions d'emploi du test sur sang total, imposent des conditions telles que la cinétique de la CK ne se développe pas dans des conditions optimales. Ceci pourrait se traduire par une perte de sensibilité globale du test, mais nous avons pu montrer que, la sensibilité de la réaction couplée révélatrice, utilisant le système luciférine-luciférase, compensait largement ce phénomène.

De la sensibilité de la réaction, dépend le seuil de positivité. Rappelons que la sensibilité, qui, est le rapport entre le signal mesuré et l'activité de l'enzyme dans l'échantillon, est limitée dans notre réaction par un "bruit de fond" — dû à la production d'ATP en-dehors du système enzymatique de la CK.

Nous avons vu que le facteur déterminant est la concentration d'ADP qui doit être suffisante pour que la réaction de la CK se développe normalement, mais assez faible pour que la production endogène d'ATP, n'augmente pas le bruit de fond.

Le pH de la réaction est un compromis entre le pH optimum de la CK et du système ATP - LL. Le signal mesuré dans la réaction est une intensité de bioluminescence, et non pas une variation de concentration d'un substrat ou d'un produit de réaction dans le milieu réactionnel.

Les unités de mesure sont donc arbitraires, et les procédés classiques d'étalonnage ne sont pas applicables. Il nous a donc fallu établir une comparaison entre les activités enzymatiques mesurées par la méthode utilisée et exprimées en Unités Lumières, et les activités enzymatiques mesurées par la méthode d'OLIVER et ROSALKI (158). Le seuil de positivité a été choisi à 30 UL ce qui correspond à 300 ou 400 UI. On pourra remarquer et s'étonner d'un coefficient de variation global de 25 %. Cependant, malgré cette absence relative de précision, la fiabilité du test n'est pas suspecte, car d'après notre expérience, l'activité sérique CK la plus basse observée sur 15 déterminations réalisées au cours des mois qui suivent la naissance chez les 9 myopathes dépistés, a été de 780 UI taux correspondant à plus de 100 UL.

D'autre part, aucun des 99 enfants chez lesquels nous avons obtenu une activité sérique CK comprise entre 30 et 100 UL ne s'est révélé myopathe après au maximum 3 ans.

Enfin, le pourcentage de cas "faux-positifs" (1,7 / 1000 du nombre des tests réalisés) est acceptable. Ce chiffre correspond à 17 "faux-positifs" pour un malade confirmé.

Ainsi, sur des données uniquement théoriques, nous avons fixé le seuil de positivité à 30 UL. Les résultats obtenus après 3 ans d'utilisation systématique du test confirment la validité de ce choix.

On pourrait nous opposer que les taux de CK (540 UI) trouvés in utero (126) (191), sont à la limite de notre seuil de positivité ; mais le seuil a été fixé sur la base des taux rencontrés chez les myopathes nouveaux-nés (dont l'augmentation du taux de CK est de 20 à 100 fois la valeur normale).

La réaction catalysée par la CK n'est pas inhibée par des taux normaux d'acide urique et taux thérapeutiques d'acide acétyl salicylique (21).

La réaction ne pourrait donc être mise en défaut que par une mauvaise conservation des réactifs. C'est pourquoi, nous incorporons deux prélèvements "positifs" dans chaque série de mesure.

Le bon déroulement de la réaction peut aussi être objectivé par l'obtention des valeurs normales aux environs de 12 UL.

Ainsi, nous avons montré que la réaction de screening répond aux deux premiers critères proposés par le Comité "Foetus and New Born" de l'académie Américaine de Pédiatrie (35).

— *"Le test de screening doit être simple, bon marché et facile à réaliser sur des petits échantillons facilement prélevés. Ces échantillons doivent être stables pendant la durée du transport au laboratoire"*.

— *"Le screening doit être suffisamment sensible pour identifier tous les cas. Il peut y avoir un certain nombre de cas "faux-positifs", mais aucun cas "faux-négatif"*.

De plus, il existe des moyens rapides et facile à mettre en oeuvre par une équipe expérimentée, faisant appel à des techniques fiables, afin d'identifier rapidement les cas positifs.

L'incidence de la maladie justifie son dépistage. En effet, nous avons constaté une incidence de l'ordre de 1/5000 garçons viables. Ce chiffre concorde avec celui de la prévalence que nous avons calculé à partir de l'enquête du CRAI dont le Docteur LACHANAT nous a communiqué les résultats : 60 myopathes sont actuellement recensés dans les 4 départements du Rhône, Ain, Loire et Ardèche. Compte tenu de leur durée de vie moyenne de 20 ans, il doit en naître environ 3 par an, soit 9 en 3 ans. (104).

La myopathie est une maladie connue du grand public, autant par sa fréquence que par sa gravité — et notre arme dans la lutte contre la DMD est avant tout l'information.

D'ailleurs, le public se sent concerné par la myopathie. Cette affirmation est étayée par les résultats de l'enquête que ZELLWEGER (219) a réalisée aux Etats Unis :

A la question : *"S'il était possible de diagnostiquer la DMD, dès la naissance, c'est-à-dire plusieurs années avant que la maladie ne se manifeste cliniquement, désireriez-vous, en tant que parents, connaître ce diagnostic"*. 90 % des personnes interrogées répondirent positivement.

Notre expérience personnelle est également encourageante à cet égard.

— Sur 200 familles avec lesquelles le service de génétique est entré en relation à la suite des résultats du dépistage, 156, soit 78 % se sont rendues à la convocation. Un tel pourcentage de réponses positives ne peut être atteint que si le médecin accoucheur traitant et la famille ont une entière confiance dans le service de génétique, confiance sans laquelle aucune collaboration n'est possible.

L'aspect technique du dépistage de la DMD étant résolu et en particulier la fiabilité du test étant confirmée par les résultats obtenus, le généticien se trouve désormais confronté à un problème nouveau.

En annonçant aux parents que leur fils qui vient de naître, apparemment sain, est atteint de myopathie, il est conduit à les placer dans une situation difficile et délicate :

— Il ne peut proposer de traitement satisfaisant (162) pour l'enfant lui-même.

— Il doit demander au couple de prévenir les femmes apparentées du côté maternel du risque génétique encouru.

Les perspectives d'une thérapeutique satisfaisante sont reculées du fait que la DMD, comme on a tendance à l'admettre actuellement, semble être une maladie de "système". Cette conception pathogénique relativement récente est étayée par l'ubiquitarité des anomalies décrites :

- diphényloxydase plaquettaire (47),
- altération des membranes érythrocytaires (128, 139),
- altération de la membrane musculaire (172, 179),
- trouble de la pompe au "sodium" (134),
- anomalie de répartition du gallium 67 (22).

De nombreux tissus et organes ont été explorés et les anomalies des phosphates au niveau des muscles (12) apparaissent bien comme secondaires.

Par conséquent, le bénéfice réel du dépistage systématique néonatal de la DMD, est le recensement précoce des femmes suspectes d'être transmettrices, ce recensement doit permettre une information génétique précoce et à terme la diminution du nombre de myopathes.

L'information génétique doit en fait s'adresser à toutes les femmes suspectes et ne pas être limitée aux conductrices dont le diagnostic formel a été établi (31 % des femmes suspectes) (161). En effet :

— même si tous les examens nécessaires au diagnostic sont négatifs, il n'est pas permis d'affirmer qu'une femme suspecte n'est pas conductrice.

— l'attitude de ROSES (173) est encore plus radicale : il considère que toutes les femmes suspectes sont conductrices tant que la preuve du contraire n'a pas été établie.

Pour la consultante qui ne désire pas ou plus avoir d'enfants, le généticien propose une contraception chimique ou, si elle a plus de 40 ans, la stérilisation tubaire.

Dans le cas où la consultante désire procréer, ou bien si elle est déjà enceinte de moins de 16 semaines, la seule proposition que le généticien puisse actuellement présenter est celle du diagnostic pré-natal.

Actuellement ce diagnostic se limite à la détermination du sexe foetal par la recherche de chromatine sexuelle ou l'étude du caryotype sur culture de fibroblaste à partir de cellules foetales prélevées par amniocentèse à la 16ème semaine. L'interruption volontaire de grossesse est envisagée lorsque le foetus est de sexe mâle. La décision est grave pour trois raisons :

- Après trois mois de grossesse le risque de l'interruption volontaire de grossesse augmente et il ne doit pas être négligé.
- Statistiquement une interruption de grossesse sur deux porte sur un foetus sain.
- Il faut savoir que l'élimination systématique des foetus mâles dans les familles myopathes risque d'entraîner une augmentation sensible du nombre de transmettrices (156).

PERSPECTIVE D'AVENIR DU DIAGNOSTIC PRENATAL DE DMD

Les méthodes de diagnostic prénatal de DMD rapportées dans la littérature, reposent sur trois principes différents :

- examen au microscope électronique des fibroblastes obtenus à partir des cellules foetales mises en culture (217),
- évaluation du taux de CK dans le sang placentaire (63, 126, 191),
- mise en évidence d'une anomalie de l'incorporation de la Proline tritiée dans le collagène sur culture de fibroblastes (90).

Les conséquences bénéfiques de ce diagnostic prénatal devraient se manifester à court terme par une réduction de l'incidence de la DMD dans la population générale.

HURSE et KAKULAS (87) ont montré que grâce au Conseil Génétique (conduisant à la contraception ou à l'interruption volontaire de grossesse), l'incidence de la DMD dans l'ouest de l'Australie est passée de 41 cas entre 1950 et 1954, à 7 cas entre 1965 et 1969 pour 100.000 naissances d'enfants mâles pendant ces deux périodes.

HUTTON et THOMPSON (88) ont observé une diminution de la fréquence de la DMD dans des familles à risque, les femmes ayant bénéficié du Conseil Génétique fondé sur le calcul de risque par la méthode BAYESSIENNE.

Un programme de dépistage systématique néonatal de la DMD, tel que celui que nous avons entrepris depuis 1975 dans la région Rhône-Alpes, doit en fait conduire dans l'avenir à un recours fréquent aux méthodes de diagnostic prénatal. Nous pensons que celui-ci se développera grâce aux possibilités de prélèvement de sang foetal in utero.

Sa réalisation en pratique courante augmentera le bénéfice du dépistage systématique néonatal. Ce dernier, par sa précocité et sa simplicité, constitue d'ores et déjà l'un des éléments essentiels de l'aide que la Société doit apporter aux familles de myopathes, et de la lutte qu'elle doit conduire contre la myopathie.

CONCLUSIONS

Le travail qui fait l'objet de cette thèse nous a été confié par les Professeurs J. COTTE, J.M. ROBERT et C. COLLOMBEL.

Ses objectifs principaux en étaient tout d'abord l'étude de la fiabilité d'un test de dépistage systématique néonatal de la myopathie de DUCHENNE de BOULOGNE ; ensuite l'analyse des résultats obtenus dans son principe et sa réalisation pratique.

1^o) Il semble prouvé que l'activité sérique de la créatine kinase est constamment élevée à la naissance dans la maladie de DUCHENNE. Cette caractéristique semble être, dans certaines limites, spécifique. La recherche systématique à la naissance de cette augmentation peut servir de base à un programme de dépistage néonatal de la myopathie de DUCHENNE.

2^o) La réaction couplée : "Créatine kinase - Luciférine-Luciférase" s'est révélée parfaitement adaptée à ce dépistage, à condition de respecter certains impératifs techniques :

- utilisation d'extrait brut de lucioles, apportant en particulier la pyrophosphatase. Cette enzyme, détruisant le pyrophosphate formé (au cours du premier temps de la réaction, par la destruction de l'ATP apportée par l'échantillon à analyser), est indispensable au bon déroulement de la réaction.

- l'échantillon à analyser et l'extrait brut apportant des activités non négligeables d'adénylate kinase, la concentration d'ADP choisie (0,1 mM) est un moyen terme entre les conditions optima d'activité de la créatine kinase et le maintien d'une production non spécifique minimum d'ATP.

- le pH choisi (pH 7,4) est un compromis entre le pH optimum de la réaction de la créatine kinase et le pH optimum de la réaction Luciférine-Luciférase.

Dans ces conditions, la réaction globale est linéaire et admet un coefficient de variation de 4,2 % (moyenne 38,59 Unités Lumière).

3^o) L'utilisation de prélèvements de sang séché sur support de papier est possible. Dans ces conditions, le coefficient de variation est de 20,7 % (moyenne 50,75 Unités Lumière). Ce chiffre apparemment élevé est tout à fait compatible avec un dépistage de masse.

Le seuil de positivité a été fixé à 30 Unités Lumière, chiffre très inférieur à l'activité de la créatine kinase la plus faible constatée chez un malade myopathe (supérieur à 100 UL).

4^o) L'ensemble des caractéristiques de ce test a permis son insertion très aisée dans les structures de l'organisation régionale de dépistage systématique néonatal de la phénylcétonurie et de l'hypothyroïdie congénitale.

5^o) Les résultats obtenus sont les suivants :

- nombre de tests réalisés : 109.106 (du 18 Juin 1975 au 1er Avril 1978),
- nombre de tests positifs : 200
- nombre de familles répondant à la convocation du service de génétique : 156,
- nombre de cas de myopathie confirmée : 9,
- nombre de tests faussement "positifs" : 147.

Ces résultats à eux seuls confirment :

- l'incidence de la myopathie (1 cas pour 5.000 naissances mâles viables),
- l'intérêt du dépistage précoce qui, dans l'avenir, devrait conduire au développement du diagnostic spécifique prénatal de la myopathie, et qui, d'ores et déjà, constitue un élément efficace de lutte contre la myopathie.

RESUME

Le dépistage systématique néonatal de la myopathie de Duchenne de Boulogne (DMD), devrait permettre, grâce au recensement précoce des femmes suspectes d'être transmettrices, une information génétique plus efficace auprès des familles à risque.

Un test de dépistage systématique a été proposé en 1975 par ANTONIK.

Le sujet de travail présenté dans cette thèse était d'en étudier les caractéristiques et d'en analyser les résultats obtenus après trois années d'utilisation en dépistage de masse.

I — Le premier chapitre de la thèse est consacré à la description du test et à l'étude de ses caractéristiques :

Le principe en est fondé sur l'augmentation constante et quasi spécifique de l'activité de la créatine-kinase dans le sang des nouveaux-nés myopathes.

Le prélèvement de sang peut être effectué sur support papier et adressé par la poste au laboratoire du Centre de Dépistage.

La réaction mise en oeuvre se déroule en deux étapes :

1^o étape : Une pastille de papier calibrée, imprégnée de sang séché est incubée 24 heures dans un milieu tamponné contenant le système enzymatique luciférine-luciférase en large excès. Au cours de cette étape :

- . la créatine kinase est éluée et réactivée par le dithiotreitol,
- . l'ATP des globules rouges est consommé dans une réaction originale de bioluminescence, produite par le système enzymatique luciférine-luciférase.

2^o étape : la créatine-phosphate, substrat spécifique de la créatine-kinase, est ajoutée au milieu réactionnel. La quantité d'ATP formée, qui ne dépend alors que de l'activité de la créatine kinase de l'échantillon, est mesurée par la bioluminescence produite dans la réaction : "ATP - Luciférine-Luciférase".

II — Le deuxième chapitre comporte l'étude critique des principaux paramètres de la réaction de bioluminescence "ATP - Luciférine-Luciférase". Le système enzymatique luciférine-luciférase extrait de *Photinus Pyralis* (luciole) peut être employé soit brut soit purifié. L'étude bibliographique et nos travaux personnels ont montré que l'emploi de l'extrait brut était obligatoire. On peut ainsi mettre à profit la présence d'une impureté enzymatique, la pyrophosphatase, dont le rôle a été particulièrement étudié. D'une part, elle est responsable de la persistance de la bioluminescence pendant les quatre premières heures du premier temps de la réaction. D'autre part elle permet la destruction dans le milieu réactionnel, du pyrophosphate produit au cours du premier temps de la réaction par l'activité

parasite de l'adénylate-kinase (apportée à la fois par les réactifs et par l'échantillon), et par l'hydrolyse de l'ATP préexistant dans l'échantillon. Ce pyrophosphate en l'absence de pyrophosphatase serait inhibiteur de la production de bioluminescence lors du deuxième temps de la réaction.

Par ailleurs, l'emploi d'une concentration 0,1 mM d'ADP, permet de limiter l'activité de l'adénylate kinase (alors que l'AMP ou les fluorures ne peuvent être employés dans ces conditions).

III – Dans le troisième chapitre les conditions de couplage des systèmes "Créatine-kinase Luciférine-Luciférase", ont été étudiées en détail.

Il est apparu que :

- l'emploi de la concentration 0,1 mM d'ADP, bien qu'elle ne corresponde pas aux conditions "optimum" de l'activité créatine-kinase, non seulement n'entraîne pas de baisse de la sensibilité de la réaction globale, mais encore, empêche l'apparition du bruit de fond, dont l'adénylate kinase est en grande partie responsable.

- le pH choisi (7,3) est un compromis entre le pH optimum de la créatine-kinase (6,9) et de la luciférine-luciférase (7,8).

Les conclusions d'une approche mathématique de la cinétique de la réaction globale sont confirmées par les résultats expérimentaux obtenus.

L'étude de la spécificité, de la linéarité, du phénomène de Quenching, et de la correspondance avec les valeurs obtenues par la méthode d'OLIVER et ROSALKI optimisée par la Société allemande de Biologie Clinique, ainsi que l'étude de la précision, nous ont permis de conclure que la réaction de screening proposée est fiable.

Enfin, nous avons montré que le prélèvement de sang sur support papier (expédié par la poste), permet une bonne conservation de l'activité enzymatique. L'influence des conditions de prélèvement, et en particulier, celle des contaminations éventuelles par les antiseptiques locaux employés au niveau du prélèvement, a été évaluée.

IV – Cette étude ayant montré que les conditions de la réalisation pratique du test étant conformes aux recommandations de l'O.M.S. et du Comité "Foetus and Newborn" de l'Académie Américaine de Pédiatrie, et permettant d'intégrer le programme de dépistage néonatal systématique de la DMD dans les structures mises en place en 1969 dans la région Rhône-Alpes par l'Association Régionale pour le dépistage et l'Etude des Maladies Métaboliques de l'Enfant (dépistage de phénylcétonurie), les résultats obtenus au cours d'un programme de 33 mois (18 Juin 1975 - 1er. Avril 1978) ont été analysés :

- nombre de tests réalisés : 109.100.
- nombre de tests "positifs" : 200
- nombre de tests contrôlés : 156
- nombre de myopathes confirmés : 9
- nombre de tests "faux-positifs" : 147

Le dépistage précoce des 9 enfants myopathes a permis de recenser 28 femmes conductrices suspectes, parmi lesquelles trois diagnostics de conductrices certaines ont été établis. Ces 28 femmes ont bénéficié ou bénéficieront d'une information génétique efficace puisque très précoce.

Un programme de dépistage systématique néonatal de la DMD, tel que celui que nous avons entrepris depuis 1975 dans la région Rhône-Alpes, doit en fait conduire dans l'avenir à un recours fréquent aux méthodes de diagnostic prénatal. Nous pensons que celui-ci se développera grâce aux possibilités de prélèvement de sang foetal "in utero". Sa réalisation en pratique courante augmentera le bénéfice du dépistage systématique néonatal. Ce dernier, par sa précocité et sa simplicité, constitue d'ores et déjà l'un des éléments essentiels de l'aide que la Société doit apporter aux familles de myopathes, et de la lutte qu'elle doit conduire contre la myopathie..



SUMMARY

The systematic neonatal screening of the Duchenne de Boulogne myopathy (DMD) should enable, thanks to precocious counting of suspicious women to be transmitting, a more efficient genetic information to families liable to be concerned.

A systematic screening test was suggested by ANTONIK in 1975.

The subject of this thesis dealt with a study of the characteristics and an analysis of the results obtained after three years of use in mass screening.

I - The first chapter of the thesis is devoted to the description of the test and the study of its characteristics :

The principle consists in a constant quasi-specified increase of the activity of creatine-kinase in the blood of myopathic new-born children.

Blood samples may be taken on paper support and sent by mail to the screening center laboratory.

The reaction, carried into effect, occurs in two stages :

1st stage : A lozenge of graded paper, impregnated with dried blood is incubated 24 hours in a buffer medium containing exceeding the luciferine-luciferase enzymatic system. During this stage :

- . creatine kinase is eluted and reactivated by dithiotreitol.
- . ATP of red globules is consumed in an original bioluminescence reaction produced by the enzymatic system luciferine-luciferase.

2nd stage : creatine-phosphate, a specific substrate of creatine-kinase is added to the reactional medium. The quantity of ATP formed, only depending then on the activity of the creatine-kinase of the sample, is measured by bioluminescence produced, in the reaction : "ATP - luciferine-luciferase".

II - The second chapter involves a critical study of the main parameters of the bioluminescence reaction "ATP - luciferine-luciferase". The enzymatic system luciferine-luciferase extracted from *Photinus Pyralis* (luciola) may be used either raw or purified. A bibliographic study and our own works showed that the use of raw extract was compulsory. Thus we may turn to account the presence of some enzymatic contaminant pyrophosphatase, whose action was more particularly studied. On one hand, it is responsible for the persistence of bioluminescence during the first four hours of the first period of the reaction. On the other hand, it enables the destruction in the

reactional medium of the pyrophosphate produced during the first period of the reaction by parautic activity of adenylate-kinase (provided both by the reagents and the sample) and by hydrolysis of ATP preexisting in the sample. During the absence of pyrophosphatase, this pyrophosphate would inhibit the production of bioluminescence during the second period of the reaction.

Besides, the use of a 0.1 mM ADP concentration enables to limit the adenylate kinase activity (whereas AMP or fluorides cannot be used in these conditions).

III - In the third chapter, the conditions for coupling these systems "creatine-kinase/luciferine-luciferase" were studied in detail.

It appeared that :

- the use of the 0.1 mM ADP concentration, although it does not correspond to the "optimum" conditions of the creatine-kinase activity, first does not lead to a decrease of the global reaction sensitivity and second prevents the apparition of a back-ground noise whose adenylate kinase is mainly responsible for.

- The selected pH (7.3) is a compromise between the optimum pH of creatine kinase (6.9) and luciferine-luciferase (7.8).

The conclusions drawn by a mathematical approach of the kinetics relevant to the global reaction are confirmed by the obtained experimental results.

A study of the specificity, the linearity of the Quenching phenomenon and the correspondance with the values obtained by the OLIVER and ROSALKI method optimized by the German Society of Clinical Biology, as well as the study of accuracy, enabled us to conclude that the suggested screening reaction is reliable.

Finally, we showed that the blood taking on paper support (dispatched by mail) enables a good preservation of the enzymatic activity. The influence of the taking conditions and in particular that of possible contaminations by the local antiseptics used for taking was estimated.

IV - This study, having shown that the conditions for a practical realization of the test conform the W.H.O. recommendations and the "Foetus and Newborn" Committee of the US Academy of Pediatrics, and enabling to integrate the systematic neonatal screening program of DMD in the Rhône-Alpes area by the local Association for the case-finding and study of the child metabolic diseases (case-finding of phenylketonuria), the results obtained during a 33 month program (June 18th - 1975 - April 1st 1978) were analyzed :

- number of realized tests : 109,100
- number of "positive" tests : 200
- number of controlled tests : 156
- number of confirmed myopathic patients : 9
- number of "wrong-positive" tests : 147

The precocious screening of 9 myopathic children enabled to count 28 suspicious transmitting women among whom three diagnoses showing sure transmitters were established. These 28 women took advantage or will take advantage of efficient genetic information because very precocious.

A systematic neonatal screening DMD program, such as that we have been undertaking since 1975 in the Rhône-Alpes area, must in fact lead in the future to frequent recourse to prenatal diagnosis methods. We think it will develop thanks to the "in utero" foetal blood taking possibilities. Its realisation in current practice will increase the advantage of systematic neonatal case-finding. The latter, because of its precocity and simplicity, constitutes right now one of the main elements of the assistance that this Society has to bring to the myopathic patients families and of its combat against myopathy.



BIBLIOGRAPHIE

- 1 – **ADDIS P.B., ANTONIK A.**
The creatine kinase - Luciferase coupled reaction : Biochemical and clinical applications.
Scientific Journal-Series Paper n^o 9899 - Minnesota Agricultural
Experiment Station. 2nd Biannual ATP Methodology Symposium, 1977
San Diego - California.

- 2 – **ANTONIK A.**
Method for the determination of creatine phosphokinase enzyme.
US. Patent Application. 1974, 493. 874.

- 3 – **ARAKI S.**
Myopathy in Japan.
Special Issues of the 17th Annual Meeting of Japanese Society of Medecine,
1967, 4, 1014-1015 (en japonais)

- 4 – **BADY B.**
Semeiologie clinique et electromyographique d'une atrophie musculaire.
Cahiers Médicaux Lyonnais, 1971, 47, 349.

- 5 – **BAYLEY P.M., THOMSON A.R.**
The thiol groups and subunit structure of creatine kinase.
Biochem. J., 1967, 104, 33.

- 6 – **BECKER P.E., KEINER F.**
Eine neue X-chromosomale Muskeldystrophie.
Arch. Psych. Nervenkr., 1955, 193, 427.

- 7 – **BECKMANN R.**
Detection of preclinical Duchenne muscular dystrophy and its female carriers.
Proc. Symp. Muscular. Dystrophy. Jerusalem, 1976.
ROBIN G.C., FALEWSKI DE LEON G. ed. 1977, 18-22.

- 8 – **BECKMANN R., SCHEUERBRANDT G.**
Screening auf erhöhte CK - Aktivitäten der Kinderarzt,
1976, 11, 1267.

- 9 – BECKMANN R., SCHEUERBRANDT G., ANTONIK A., ANTONIK S.
Ein neuer kreatinkinase test
Der Kinderarzt, 1974, 5, 731.
- 10 – BECKMANN R., SCHEUERBRANDT G., ANTONIK A., ANTONIK S.
Neuer CPK-Massen - screening-test zur Früherfassung von Muskelkrankheiten.
Fortschr. Med. 1974, 92, 1348.
- 11 – BERGMAYER H.U.
Determination of ADP, ATP and Sum of GTP + ITP in Biological Material
Methods of Enzymatic analysis. BERGMAYER Ed. 1974, 4, 2078.
- 12 – BERTHILLIER G., GAUTHERON D., ROBERT J.M.
Fractions phosphorylées et nucléotides adényliques libres de muscles myopathiques
chez l'enfant.
C.R. Acad. Sc. Paris, 1967, 265, 79.
- 13 – BEUTLER E.
A serie of new screening procedures for pyruvate-kinase deficiency glucose-6-phosphate
dehydrogenase deficiency and glutathion reductase deficiency.
Blood, 1966, 8, 553.
- 14 – BEUTLER E., BALUDA M.E.
Simplified determination of blood adenosine triphosphate using the firefly system.
Blood, 1964, 23, 688.
- 15 – BITLER B., Mc ELROY W.D.,
The preparation and properties of crystalline firefly luciferine.
Arch. Biochem. Biophys., 1957, 72, 358.
- 16 – BLUM D., BRAUMAN J.
Serum enzymes in the neonatal period. Diagnostic aid in muscle pathology.
Biol. Neonate. 1975, 26, 53.
- 17 – BLYTH H., HUGHES B.P.
Pregnancy and serum CPK levels in potential carriers of "severe" X-linked muscular
dystrophy.
Lancet. 1971, 1, 855.
- 18 – BLYTH H., PUGH R.J.
Muscular dystrophy in childhood. The genetic aspect.
Ann. Human. Genet. 1959, 23, 127.

- 19 – **BODENSTEINER J., ZELLWEGER H.**
Utilization of capillary blood for serum enzyme analysis.
Helv. Paediatric. Acta. 1970, **25**, 397.
- 20 – **BODENSTEINER J., ZELLWEGER H.**
Creatine phosphokinase in normal neonates and young infants.
J. Lab. Clin. Med. 1971, **77**, 853.
- 21 – **BONNARDOT A.M., DORCHE C., GUIDOLLET J., MATHIEU M.**
Mesure d'activité de la créatine kinase du plasma : essai d'optimisation à 30° C.
In : Biologie Prospective - 3e Colloque de Pont à Mousson 1975.
Expansion Scientifique Française, 1976. p. 275.
- 22 – **BOWEN P., LENTLE B.C., JACKSON F.I., PERCY S.S., RIGAL W.M.**
Abnormal localisation of Gallium 67 citrate in Pseudo hypertrophic muscular dystrophy.
Lancet, 1977, 1072.
- 23 – **BRITT B.A., ANTONIK A.**
A simplified method for measuring blood creatine kinase in malignant hyperthermia
suceptible (MHS) patients.
(à paraître).
- 24 – **BROCHET J.C.**
Etude statistique des variations de la creatine phosphokinase avant et après effort.
Applications en médecine préventive.
Thèse de Pharmacie - Nancy, 1973.
- 25 – **BROOKS A.P., EMERY A.E.**
The incidence of Duchenne muscular dystrophy in the South east of Scotland.
Clin. Gen. 1977, **11**, 290.
- 26 – **BROWNLOW K., ELEVITCH P.**
Serum creatine phosphokinase isoenzyme in myositis.
J. Amer. Med. Ass. 1974, **230**, 1141.
- 27 – **CAO A.**
Serum creatine phosphokinase et serum creatine phosphokinase isoenzymes in new
born infants.
Biol. Neonate. 1971, **17**, 126.
- 28 – **CAO A., DE VIRGILLIS S., LIPPI C., TRABALZA N.**
Creatine kinase isoenzymes in serum of children with neurological disorders.
Clin. Chim. Acta. 1969, **23**, 475.

- 29 – **CARRIER H., ROBERT J.M., RICHARD J.**
Etude histoenzymologique et ultrastructurale du muscle squelettique des conductrices présumées de la myopathie de Duchenne.
Ve. Journées du Club Européen du Conseil Génétique. CAMUGLI, 1977.
- 30 – **CHADD M., GRAY O.P., SAUNDERS R.A., JONES R.T.**
Serum aldolase and phosphocreatine kinase in umbilical cord blood.
J. Clin. Path. 1966, 19, 600.
- 31 – **CHAPELLE E.W., LEVIN G.V.**
Use of the Firefly Bioluminescent reaction for rapid detection and counting of Bacteria.
Biochem. Med. 1969, 2, 41.
- 32 – **CHASE A.M.**
The measurement of luciferin and luciferase. Methods of Biochemical analysis.
D. GLICK ed. - New York Interscience, 1960, 8, 61.
- 33 – **CHAZOT G., FOURNIS Y., ROBERT J.M., AIMARD G., DEVIC M.**
Serum creatine phosphokinase changes during lithium therapy on patients with muscular dystrophy Duchenne type.
Lyon Med. 1972, 228, 421.
- 34 – **CHUNG C.S., MORTON N.E.**
Discrimination of genetic entities in muscular dystrophy
Amer. J. Genet. 1959, 11, 339.
- 35 – **COMMITTEE on FETUS and NEWBORN**
American Academy of Pediatrics Screening of newborn in foetus for metabolic disease.
Pediatrics, 1965, 35, 499.
- 36 – **COTTE J., NIVELON J.L., COLLOMBEL C., HERMIER M.**
Enzymogramme sérique en pathologie musculaire.
J. Med. Lyon, 1965, 46, 1759.
- 37 – **DALAL F.R., CILLEY J., WINSTEN S.**
Study of the problems of inactivation of creatine kinase in serum.
Clin. chem. 1972, 18, 330.
- 38 – **DELLAMONICA C., DORCHE C., COLLOMBEL C., ROBERT J.M.**
Dépistage néonatal systématique de la myopathie de Duchenne de Boulogne.
Résultats de deux années d'expérience.
Vème Journées Européennes de Conseil Génétique, 1977, Camugli Italie.

- 39 – DE LUCA M.
Advances in Enzymology. Firefly luciferase.
MEISTER A. Ed.
Interscience publication, 1976, 44, 37.
- 40 – DE LUCA M., MAC ELROY W.D.
Kinetics of the firefly luciferase catalysed reactions
Biochemistry, 1974, 13, 921.
- 41 – DEMOS J.
Contribution à l'étude de la myopathie humaine.
Thèse, Médecine - Paris 1957.
- 42 – DEMOS J.
Diagnostic positif précoce des myopathies de l'enfant.
Vie. Med. 1968, 49, 1084.
- 43 – DEMOS J.
La détection des porteuses saines du trait myopathique dans la myopathie humaine.
Ann. Génét. 1969, 12, 191.
- 44 – DEMOS J.
Présence d'une amino-diphénoloxydase dans les plaquettes sanguines humaines.
Existence d'un variant de cette enzyme chez les malades atteints de myopathie.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 1968, 267, 677.
- 45 – DEMOS J.
Early diagnosis and treatment of rapidly developing Duchenne de Boulogne type myopathy.
Amer. J. Phys. Med. 1971, 50, 271.
- 46 – DEMOS J.
La myopathie type Duchenne de Boulogne à évolution rapide (type DDBI).
Diagnostic précoce et traitement.
Conc. Med. 1971, 93, 8088.
- 47 – DEMOS J., BERTHELON M.
Intérêt diagnostic et génétique des mesures d'activité des diphénoloxydases plaquettaires.
Arch. Franç. Pediat. 1972, 29, 793.
- 48 – DEMOS J., KATZ P., TUIL D., BERTHELON M.
Intérêts et nouveautés des dosages enzymatiques au cours des myopathies.
Rev. Med. 1977, 19, 917.

- 49 – DENBURG J.L., LEE R.T., MAC ELROY W.D.
Substrate binding properties of firefly luciferase
Arch. Biochem. Biophys. 1969, 134, 381.
- 50 – DESSEMOND M.,
Le dépistage systématique des maladies métaboliques curables du nouveau-né
dans la région Rhône-Alpes.
Thèse Médecine, Lyon, 1968.
- 51 – DORAN G.D., WILKINSON J.H.
Serum creatine kinase and adenylate kinase in thyroïd disease.
Clin. Chim. Acta. 1971, 35, 115.
- 52 – DORCHE C.
Le dépistage systématique de la galactosémie et du déficit en glucose-6-phosphate
deshydrogenase par les spot-tests de fluorescence.
Thèse Pharmacie - Lyon, 1969.
- 53 – DORCHE C., ROLLAND M.O., DELLAMONICA C., COLLOMBEL C., COTTE J.
Bilan de 7 années de fonctionnement d'un service de dépistage néonatal des maladies
métaboliques.
C.R. Société Suisse, Chim. Clin. Lausanne, 1976.
- 54 – DORCHE C., ROLLAND M.O., COLLOMBEL C., COTTE J., DESSEMOND M.,
ROBERT J.M.
Le dépistage systématique à la naissance de la phénylcétonurie dans la région Rhône-Alpes.
Pédiatrie, 1974, 29, 91.
- 55 – DREYFUS J.C., SCHAPIRA G., DEMOS J.
Etude de la créatine kinase sérique chez les myopathes et leurs familles.
Rev. Fse. Et. Clin. Biol., 1960, 5, 384.
- 56 – DREYFUS J.C., SCHAPIRA F., DEMOS J., ROSA R., SCHAPIRA C.
The value of serum enzyme determination in the identification of dystrophy carriers.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1965, 138, 304.
- 57 – DREYFUS J.C., SCHAPIRA G., SCHAPIRA F.
Serum enzymes in the physiopathology of muscle.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1958, 75, 235.
- 58 – DUBOIS R.
C.R. Acad. Sci. Paris, 1887, 105, 690.
- 59 – DUBOWITZ V.
Histochemical aspects of muscle disease in : Disorders of voluntary muscle.
by, WALTON J.N. 3rd Ed., 1974, 310.

- 60 – DUBOWITZ V.
Carrier detection and genetic counselling in Duchenne dystrophy
Develop. Med. Child. Neurol. 1975, 17, 352.
- 61 – DUBOWITZ V.
Screening for Duchenne muscular dystrophy.
Arch. Dis. Child. 1976, 51, 249.
- 62 – DUBOWITZ V.
Duchenne Muscular Dystrophy early diagnosis and screening.
Arch. Dis. Child. 1976, 51, 983 (Correspondence).
- 63 – DUBOWITZ V., VAN IDEKINGE B., RODECK C.H., CAMPBELL S., SINGER S.D.,
SCHEUERBRANDT G., MOSS D.W.
Prenatal diagnosis in Duchenne muscular dystrophy. Salvage of normal male foetus.
Lancet, 1978, 90.
- 64 – DUCHENNE G.B.
Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie
myosclérosique.
Arch. Gen. Med. 1868, 11, 569.
- 65 – EBASHI S.L., MOMOI M., TOYOKURA Y., SUGITA H.
High creatine phosphokinase activity of sera of progressive muscular dystrophy.
J. Biochim. (Tokyo), 1959, 46, 103.
- 66 – EMERY A.E.H.
Muscle histology and creatine kinase levels in the foetus in Duchenne
Muscular dystrophy.
Nature, 1977, 266, 5601.
- 67 – EMERY A.E.H., MAC GREGOR L.
The foetus in Duchenne muscular dystrophy : muscle growth in tissue culture.
Clin. genet. 1977, 12, 183.
- 68 – EMERY A.E.H., HOLLOWAY S.
Use of normal daughter's and sister's creatine kinase levels on estimating heterozygosity
in Duchenne Muscular dystrophy.
Hum. Hered. 1977, 27, 118.
- 69 – EMERY A.E.H., WATT M.S., CLACK E.R.
The effect of genetic counselling in Duchenne muscular dystrophy.
Clin. Gen. 1972, 3, 147, 150.

- 70 – ENNOR A.H., ROSENBERG H.
Some properties of creatine phosphokinase.
Biochem. J., 1954, 57, 203.
- 71 – GARDNER – MEDWIN D.
Duchenne muscular dystrophy early diagnosis and screening.
Arch. Dis. Child. 1976, 51, 982. (correspondence).
- 72 – GILBOA N., SWANSON J.P.
Serum creatine phosphokinase in normal newborns.
Arch. Dis. child. 1976, 51, 283.
- 73 – GILLES R., PEQUEUX A., SAIVE J.J., SPRONCK A.C., THOME-LENTZ G.
Effect of various ions on ATP determinations using the luciferine-luciferase system.
Arch. Internat. Physiol. Biochim., 1976, 84, 807.
- 74 – GOTO I.
Serum creatine phosphokinase isoenzymes in hypothyroidism convulsion, myocardial infarction and other diseases.
Clin. Chim. Acta. 1974, 52, 27.
- 75 – GOTO I., KATSUKI S.
Creatine phosphokinase isoenzymes in pathological human serum.
Clin. Chim. Acta. 1970, 30, 795.
- 76 – GREEN A.A., MAC ELROY W.D.
Crystalline firefly luciferase
Biochim. Biophys. Acta. 1956, 20, 170.
- 77 – GRIFFITHS P.D.
Serum levels of creatine phosphokinase.
J. Clin. Path. 1964, 17, 56.
- 78 – GRIFFITHS P.D.
Serum enzymes in disease of the thyroid gland.
J. Clin. Pathol. 1965, 18, 660.
- 79 – GRIFFITHS P.D.
The activity of ATP-phospho transferase (EC. 2.7.3.2.) in umbilical cord blood.
Clin. Chim. Acta. 1968, 20, 465.
- 80 – GROUCHY J. de
Contribution à l'étude de l'hérédité de la myopathie.
Thèse Médecine Paris 1953.

- 81 – HARVEY E.N.
Bioluminescence.
Science (Washington), 1964, 40, 33.
- 82 – HASTINGS J.W., MICHELSON A.M.
La bioluminescence.
La Recherche, 1974, 5, 1032.
- 83 – HERSCHELL-MITCHELL K.
Communication de 1955 rapportée par MAC ELROY W.D. in :
Cristalline firefly luciferase in :
COLOWICK S.P., KAPLAN M.O.
Methods in Enzymology 1963, 6, 445.
- 84 – HEYCK H., LAUDAHN G., CARSTEN P.M.
Enzymaktivitätsbestimmungen bei Dystrophia musculorum progressiva
Klinische Wochenschrift, 1966, 44, 695.
- 85 – HUGHES B.P.
A method for the estimation of serum creatine kinase and aldolase activity
in normal and pathological sera.
Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 597.
- 86 – HUGHES B.P.
Serum CPK in fascio-scapulo-humeral muscular dystrophy.
Brit. Med. J. 1971, 3, 5772.
- 87 – HURSE P.V., KAKULAS B.A.
Genetic counselling in neuromuscular disease in Western Australia
Proc. Aust. Ass. Neurol. 1974, 11, 145.
- 88 – HUTTON E.M., THOMPSON M.W.
Carrier detection and genetic counselling in Duchenne muscular dystrophy : a follow-up
study.
CMA Journal. 1976, 115, 749
- 89 – HWANG P.T.
Creatine kinase in relation to porcine stress susceptibility
Thesis of Philosophy, Minnesota, 1976.
- 90 – IONASESCU V., LARA-BRAUD C., ZELLWEGER H., IONASESCU R., BURMEISTER L.
Fibroblast cultures in Duchenne muscular dystrophy.
Acta Neurol. Scandinav., 1977, 55, 407.

- 91 – **ITELSON J., RUBINSTEIN J.**
La place des variations de l'activité de la CPK sérique, parmi les tests de la fonction thyroïdienne.
Rev. Franç. Et. Clin. Biol., 1968, 13, 905.
- 92 – **JALBERT P., MOURIQUAND C., BEAUDOING A., JAILLARD M.**
Myopathie progressive de type Duchenne et mosaïque XO/XX/XXX
considérations sur la génèse de la fibre musculaire striée.
Ann. Génét. 1966, 9, G, 104.
- 93 – **JANEWAY C.A.**
Screening for inherited diseases
N. Engl. J. Med. 1971, 284, 787
- 94 – **JEUNE M., ROBERT J.M., BOSCHETTI R., DESSEMOND M.**
L'organisation du dépistage de la phénylcétonurie dans la région Rhône-Alpes.
Pédiatrie, 1970, 24, 801.
- 95 – **JOCKERS-WRETOU E., PFLEIDERER G.**
Quantitation of creatine kinase isoenzymes in human tissues and sera by an immunological method.
Clin. Chim. Acta, 1975, 58, 223.
- 96 – **KAR N.C., PEARSON C.M.**
Activation of creatine phosphokinase by sulfhydryl compounds in normal muscular dystrophy sera.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1965, 18, 662.
- 97 – **KELLY S., COPELAND W., SMITH R.O.**
A fluorescent spot test for creatine kinase.
Clin. Chim. Acta, 1968, 21, 431.
- 98 – **KEUTEL H.S., JACOBS H.K., OKABE K., YUE R.H., KUBY S.A.**
Studies on adenosine triphosphate transphosphorylase VII. Isolation of the crystalline adenosine Triphosphate creatine transphosphorylase from calf brain.
Biochemistry, 1968, 7, 4283.
- 99 – **KIMMICH C.A., RANGLES J., BRAND J.S.**
Assay of picomole amounts of ATP, ADP and AMP using the luciferase enzyme system.
Anal. Biochem, 1975, 69, 187.
- 100 – **KOEDAM J.C.**
Creatine phosphokinase. Modified fluorimetric method.
Clin. chim. Acta, 1969, 23, 63.

- 101 – KUBY S.A., NODA L., LARDY H.A.
Adenosine triphosphate creatine transphosphorylase I. Isolation of the crystalline enzyme from rabbit muscle.
J. Biol. Chem., 1954, 209, 191.
- 102 – KUBY S.A., NODA L., LARDY H.A.
Adenosine triphosphate transphosphorylase III - Kinetic studies.
J. Biol. Chem. 1954, 210, 65.
- 103 – KUBY S.A., NOLTMANN E.A.
ATP - creatine transphorylase.
The Enzymes, Vol. 6, 2nd Ed. BOYER P.D., LARDY H., MYRBACK E. eds
page 515, Academic Press Inc. New York (1962).
- 104 – LACHANAT J., DE SALEE P.
Dossier technique : les handicapés moteurs.
Extrait du Bulletin "Relation" N° 4, 1975.
Centre Régional pour l'Enfance et l'Adolescence Inadaptée -
15 quai Jean Moulin - 69002 LYON.
- 105 – LALEIGERIE P.
Cinétique de trois réactions enzymatiques consécutives dans :
GIRARD M.L., ROUSSELET F.
Problèmes actuels de Biochimie appliquée.
MASSON Ed. 1974, 6, 47.
- 106 – LAWRENCE E.F., BROWN B., HOPKINS I.J.
Pseudohypertrophic muscular dystrophy of childhood on epidemiological survey
in victoria.
Aust. N. Z. J. Med. 1973, 3, 142.
- 107 – LEE Y., JABLONSKI I., DE LUCA M.
Immobilization of Firefly luciferase on glass rods : Properties of the Immobilized enzyme.
Anal. Biochem. 1977, 80, 496.
- 108 – LEGRAND M., PERSOZ M., PERSOZ B., ARHAN R.
Evaluation de la force musculaire et du taux de créatine phosphokinase
dans la maladie de Duchenne à évolution rapide.
Ann. Med. Phys. 1977, 20, 1.
- 109 – LEMASTERS J.J., HACKENBROCK C.R.
Adenosine triphosphate : continuous measurement in Mitochondrial
suspensions by firefly luciferase luminescence.
Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, 55, 1262.

- 110 – LEUNIS J.C.
Séparation chromatographique des isoenzymes de la créatine phosphokinase du sérum normal et après infarctus du myocarde.
Ann. Biol. Clin., 1973, 31, 369.
- 111 – LUNDIN A., THORE A.
Analytical information obtainable by evaluation of the time course of firefly bioluminescence in the assay of ATP.
Anal. Biochem. 1975, 66, 47.
- 112 – LYMAN G.E., DEVINCENZO J.P.
Determination of picogram amounts of ATP using the luciferin-luciferase enzyme system.
Anal. Biochem. 1967, 21, 435.
- 113 – LYON M.F.
Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome
Amer. J. Hum. Gent. 1962, 14, 135.
- 114 – MAC CAPRA F., WHITE E.
In "Light and life"
W.D. MAC ELROY, B. GLASS eds.
Johns Hopkins Press Baltimore, 1960.
- 115 – MAC ELROY W.D.
The energy source for bioluminescence in an isolated system.
Proc. Natl. Acad. Sci. US., 1947, 33, 342.
- 116 – MAC ELROY W.D.
Properties of the reaction utilizing adenosine triphosphate for bioluminescence
J. Biol. Chem. 1951, 191, 547.
- 117 – MAC ELROY W.D.
Cypridina and firefly luciferase in : "Methods in Enzymology"
COLOWICK S.P., KAPLAN M.O. Eds.
New York, Academic Press. 1955, 6, 431.
- 118 – MAC ELROY W.D.
Firefly luciferase
In : "The Enzymes" IIe ed.
BOYER P.D., LARDY M., MYRBACK K. ed.
New York Academic Press, 1962, 6, 431.
- 119 – MAC ELROY W.D.
Crystalline firefly luciferase in : Methods in Enzymology.
COLOWICK S.P., KAPLAN N.O. Eds.
New York Academic Press, 1963, 445.

- 120 – **MAC ELROY W.D.**
Preparation and properties of firefly luciferyl and oxyluciferyl adenylic acid.
in : "Methods in Enzymology"
COLOWICK S.P., KAPLAN N.O. Ed.
New York Academic Press 1963, **6**, 775.
- 121 – **MAC ELROY W.D., COULOMBRE J.**
The immobilization of adenosine triphosphate in the bioluminescent reaction.
J. Cellular Comp. Physiol. 1952, **39**, 475.
- 122 – **MAC ELROY W.D., DE LUCA M., TRAVIS J.**
Molecular Uniformity in biological catalyses.
Science 1967, **157**, 150.
- 123 – **MAC ELROY W.D., GREEN A.A.**
Function of adenosine triphosphate in the activation of luciferin.
Arch. Biochem. Biophys., 1956, **64**, 257.
- 124 – **MAC ELROY W.D., HASTINGS J.W., COULOMBRE J., SONNENFELD V.**
The mechanism of action of pyrophosphate in firefly luminescence.
Arch. Biochem. Biophys., 1953, **46**, 399.
- 125 – **MAC QUEEN J.**
Planning comprehensive services for handicapped children and youth
Iowa state services for crippled children.
1972, unpublished data.
- 126 – **MAHONEY M.J., HASELTINE F.P., HUBBINS J.C., BANKER B.Q., CASKEY C.T. GOLBUS M.S.**
Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy.
N. Engl. J. Med. 1977, **18**, 968.
- 127 – **MARECHAL B.**
Essai de mise au point d'un dépistage néonatal des hypothyroïdies
congénitales par dosage radioimmunologique de la thyroxine sur taches de sang séché.
Rapport de stage de 5e année de Pharmacie, option Biologie Lyon, 1977.
- 128 – **MATHESON D.W., HOWLAND S.L.**
Erythrocyte deformation in human muscular dystrophy.
Science, 1974, **184**, 165.
- 129 – **MATHIEU M., BRETAUDIERE J.P, GALTEAU M.M., GUIDOLLET J., LELEGERIE P.**
Commission enzymologie. Comité de standardisation de la S.F.B.C.
Recommandations pour la mesure de l'activité catalytique de la Créatine kinase dans
le sérum humain à 30° C. Document C stade 3.
Ann. Biol. Clin. 1976, **34**, 291.

- 130 – **MATHIEU M., ZABOT M.T., MAIRE I.**
Le diagnostic prénatal des maladies métaboliques.
Lyon Pharm. 1977, 28, 443.
- 131 – **MELTZER H.**
Chlorpromazine induced hypothermia and increased plasma CPK activity.
Biochem. Pharmacol., 1971, 20, 1739.
- 132 – **MENACHE R., RUBINSTEIN I., GAIST I., MARZIUK I.**
Creatine kinase isoenzymes in normal and pathological sera
Clin. Chim. Acta, 1968, 19, 33
- 133 – **MERCER D.W., VARAT M.A.**
Detection of cardiac specific creatine kinase isoenzyme in sera with normal or slightly increased total creatine kinase activity.
Clin. Chem. 1975, 21, 1088.
- 134 – **MIALE T.D., FRIAS J.L., LAWSON D.L.**
Erythrocytes in human muscular dystrophy.
Science, 1975, 187, 4175.
- 135 – **MIYADA M.S., DINOVO E.C., NAKAMURA R.M.**
Creatine kinase reactivation by thiols compounds
Clin. Chim. Acta. 1975, 58, 97.
- 136 – **MIYAZAKI T.**
A epidemiological, genetic and clinical study on the progressive muscular dystrophies.
Fukuoka acta Medica, 1963, 54, 1007.
- 137 – **MORIN L.G.**
Improved separation of creatine kinase cardiac isoenzyme in serum by batch fractionation.
Clin. Chem. 1976, 22, 92.
- 138 – **MORIN L.G.**
Evaluation of current methods for creatine kinase isoenzyme fractionation.
Clin. Chem., 1977, 23, 205.
- 139 – **MORSE P.F., HOWLAND J.L.**
Erythrocytes from animal with genetic muscular dystrophy.
Nature, 1973, 245, 156.

- 140 – **MORTON N.E., CHUNG C.S.**
Formal genetics of muscular dystrophy
Am. J. Hum. Genet. 1959, 11, 360.
- 141 – **MOSER M., WIESMANN U., RICHTERICH R., ROSSI E.**
Progressive muskeldystrophie. VI. Häufigkeit, klinik und genetik der Duchenne Form.
Schweiz. Med. Wschr. 1964, 46, 1610.
- 142 – **MUNSAT T.L., BALOH R., PEARSON C.M., FOWLER W.S.**
Serum enzyme alterations in neuromuscular disorders
J. Amer. Med. Ass., 1973, 226, 1536.
- 143 – **NIELSEN R., RASMUSSEN H.**
Fractionation of extracts of firefly tails by gel filtration.
Acta. chem. Scand. 1968, 22, 1757.
- 144 – **NODA L., KUBY S.A., LARDY H.A.**
Adenosine triphosphate creatine transphosphorylase II. Homogeneity and physicochemical properties.
J. Biol. Chem. 1954, 209, 203.
- 145 – **NUTTALL F.O., WEDIN D.S.**
A simple rapid colorimetric method for determination of CK activity
J. lab. Clin. Med. 1966, 68, 324.
- 146 – **OKINAKA S., KUMAGAI H., EBASHI S., SUGITA H., MOMOI S., TOYOKURA Y., FISIE Y.**
Serum creatine phosphokinase activity in progressive muscular dystrophy and neuromuscular diseases.
Arch. Neurol. 1961, 4, 520.
- 147 – **OLIVER I.T.**
A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase.
Biochem. J. 1955, 61, 116.
- 148 – **O.M.S. rapport N° 427**
Biochimie des troubles mentaux.
1969, p. 10.
- 149 – **OTTAWAY J.H.**
Evidence for binding of cytoplasmic creatine kinase to structural elements in heart muscle.
Nature, 1967, 215, 521.

- 150 – PATERSON Y.
A new screening test for serum creatine phosphokinase
Clin. Chim. Acta, 1971, 34, 373.
- 151 – PATERSON Y., LAWRENCE E.
Factors affecting serum creatine phosphokinase levels in normal adult females
Clin. Chim. Acta, 1972, 42, 131.
- 152 – PEARCE J.M.S., PENNINGTON R.S., WALTON J.N.
Serum enzyme studies in muscle disease. II. Sérum creatine kinase activity in muscular dystrophy and in other myopathic and neuropathic disorders.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 1964, 27, 96.
- 153 – PEARSON C.M.
Childhood pseudohypertrophic muscular dystrophy in : Bergsma D (ed)
Birth Defects, Atlas and Compendium. Baltimore. Williams and Wilkins Co.
1973, p. 257.
- 154 – PEARSON C.M., CHOWDURY S.R., POWLER W.M. Jr., JONES M.H., GRIFFITH W.H.
Studies of enzymes in serum in muscular dystrophy.
Pediatrics, 1961, 28, 962.
- 155 – PEARSON C.M., FOWLER W.M., WRIGHT S.W.
X-Chromosome mosaicism in females with muscular dystrophy.
Proc. Nat. Acad. Sci. 1963, 50, 24.
- 156 – PFÄNDLER U., KÄLIN A.
L'effet sélectif de l'avortement thérapeutique lorsque les enfants ainsi éliminés
sont atteints d'une tare recessive autosomique ou liée au chromosome X
J. de génétique humaine, 1972, 20, 135.
- 157 – RAIMBAULT J., RENAULT F., LAGET P.
La place de l'électromyographie dans le diagnostic des myopathies de l'enfant.
Ann. Pediat. 1977, 24, 451.
- 158 – Recommendation of the German Society for Clinical Chemistry.
Standard Method for determination of creatine kinase (CK) activity.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 1972, 6, 284.
- 159 – RHEE S.G., GREIFNER M.I., CHOCK P.B.
Determination of Adenosine 5' Triphosphate by the luciferin-luciferase system
with a stopped-flow spectrometer.
Anal. Biochem., 1975, 66, 259.

- 160 – **RHODES W.C. and MAC ELROY W.D.**
The synthesis and function of luciferyl-adenylate and oxyluciferyl adenylate.
J. Biol. Chem. 1958, 233, 1528.
- 161 – **RICHARD J.**
Vue d'ensemble de 51 conductrices presumées de la dystrophie musculaire de Duchenne,
Perspectives du Conseil Génétique.
Thèse Médecine Lyon 1977.
- 162 – **RIDEAU Y.**
Traitement et réadaptation des myopathies liées au sexe en fonction du pronostic.
Ann. Pediat. 1978, 24, 773.
- 163 – **ROBERT J.M.**
Aspect génétique des myopathies.
Ann. Pediat. 1975, 22, 110.
- 164 – **ROBERT J.M., GUIBAUD P.**
La dystrophie musculaire progressive infantile.
Monographies de génétique médicale n° 1.
Simep ed. 1966.
- 165 – **ROGET J., BEAUDOING A., JOBERT J., BOST M.**
La créatine phosphokinase au cours des états d'anoxie du nouveau-né
Pédiatrie. Lyon, 1969, 24, 163.
- 166 – **ROOS F.**
Etude des réactions des dérivés guanidiques avec les alpha-dicétones.
Applications à la mesure de l'activité de la CPK.
Thèse Pharmacie, Nancy, 1969.
- 167 – **ROOS F., GONAND J.P., SIEST G.**
Séparation électrophorétique des isoenzymes de la créatine kinase
IIIème Journées de l'Internat en Pharmacie, Nancy, 1966.
- 168 – **ROOS F., VIGNERON C., RIES-BOURGAUX M., STUDIEVIC C., SIEST G.**
Analyse automatique de la CPK : applications à la chromatographie des
iso-enzymes tissulaires.
Ann. Biol. Clin., 1969, 27, 201.
- 169 – **ROSALKI S.B.**
An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination.
J. Lab. Clin. Med. 1967, 69, 696.

- 170 – **ROSANO T.G., CLAYSON K.J., STRANDJORD P.E.**
Evaluation of adenosine 5' Mono-phosphate and fluoride as adenylate kinase inhibitors in the creatine kinase assay.
Clin. Chem. 1976, 22, 1078.
- 171 – **ROSES A.D.**
Duchenne Muscular Dystrophy early diagnosis and screening.
Arch. Dis. Child. 1976, 51, 983 (correspondence).
- 172 – **ROSES A.D., HERBSTREITH M.H., APPEL S.H.**
Membrane proteine kinase alteration in Duchenne muscular dystrophy.
Nature, 1975, 254, 350.
- 173 – **ROSES A., ROSES M., METCALF B., HULL K., NICHOLSON G., HARTWIG G. ROE C.**
Pedigree testing in Duchenne muscular dystrophy.
Ann. Neurol. 1977, 24, 271.
- 174 – **RUDOLPH N., GROSS R.T.**
Creatine phosphokinase activity in serum of newborn infants as an indicator of fetal trauma during birth.
Pediatrics, 1966, 38, 1039.
- 175 – **SAX S.M., MOORE J.J.**
Fluorometric measurement of creatine kinase activity,
Clin. Chem., 1965, 11, 951.
- 176 – **SCHAPIRA C.**
Enzymologie des myopathies.
Conc. Med. 1973, 95, 373.
- 177 – **SCHAPIRA F., DELAIN D.**
Les isoenzymes de l'aldolase et de la créatine kinase du muscle foetal atrophique et dystrophique et du muscle en culture de tissu.
Act. Path. Neuro. Musc. - Paris - Expansion Scientifique, 1971.
- 178 – **SCHAPIRA G., DREYFUS J.C., SCHAPIRA F.**
L'élévation du taux de l'aldolase sérique : test biochimique des myopathies.
Sem. Hop. Paris, 1953, 29, 1917.
- 179 – **SCHOTLAND D.L., BONILLA E., VAN METTER M.**
Duchenne dystrophy : altération in muscle plasma membrane structure.
Science 1977, 196, 1005.

- 180 – **SCHRAM E.**
Bioluminescence : fundamental and practical aspects.
Arch. Internat. Physiol. Biochim. 1973, **81**, 561.
- 181 – **SEITZ W.R., NEARY M.P.**
Chemiluminescence and Bioluminescence.
Anal. Chem. 1974, **46**, 188 A
- 182 – **SERRATRICE G., ROUX H.**
Leçons de Pathologie musculaire.
Maloine Ed. Paris 1968.
- 183 – **SETO S., OGURA K., NISHIYAMA Y.**
Bull. Chim. Soc, Japan, 1963, **36**, 332.
- 184 – **SHAW R., PEARSON C., CHOWDHURY S.**
Statistical characteristics and normal values of four serum enzymes,
glutamic oxalacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase, aldolase and
creatine phosphokinase.
Enzymol. Biol. Clin., 1966, **6**, 10.
- 185 – **SIBLEY J.W., LEHNINGER A.L.**
Aldolase in the serum and tissues of tumor bearing animals
J. Nat. Cancer. Inst. 1949, **5**, 303.
- 186 – **SMITH H.L., AMICK L.D., JOHNSON W.W.**
Detection of subclinical and carrier state in Duchenne muscular dystrophy.
J. Pediat. 1966, **69**, 76.
- 187 – **SMITH I., THOMSON W.H.S.**
Carrier detection in X linked recessive (Duchenne) muscular dystrophy :
Pyruvate kinase isoenzymes and creatine phosphokinase in serum and blood cells.
Clin. Chim. Act. 1977, **78**, 439.
- 188 – **SNEHALATHA C., VALMIKINATHAN K.**
Creatine phosphokinase level in limb girdle muscular dystrophy.
Effect of dialysis.
Clin. Chem. 1974, **51**, 315.
- 189 – **SOLTAN H.G., BLANCHER M.C.**
Activity of serum aldolase and lactate dehydrogenase in patients affected
with Duchenne muscular dystrophy and their immediate relatives.
J. Pediat. 1959, **54**, 27.

- 190 – **STANLEY P.E., WILLIAMS S.G.**
Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme.
Anal. Biochem. 1969, 29, 381.
- 191 – **STENGEL-RUTKOWSKI, SCHEUERBRANDT G., BECKMANN R., PONGRATZ D.**
Prenatal diagnosis of Duchenne's muscular dystrophy
Lancet. 1977, 1359.
- 192 – **STEPHENS F.E., TYLER F.M.**
Studies in disorders of muscle.
Amer. J. Hum. Genet. 1951. 3, 111.
- 193 – **ST JOHN**
Determination of ATP in chlorella with the luciferin luciferase enzyme system.
Anal. Biochem. 1970, 37, 409.
- 194 – **STREHLER B.L.**
Adenosine 5'-triphosphate and creatine phosphate determination with luciferase.
In : Methods of Enzymatic Analysis - H.U. BERGMAYER Ed.
Academic Press. New York, 1971, 4, 2116.
- 195 – **STREHLER B.L.**
Bioluminescence assay : principles and practice
Methods of Biochemical analysis.
GLICK D Ed. 1968, 16, 99.
- 196 – **STREHLER B.L., MAC ELROY W.D.**
Assay of adenosine triphosphate
In : Methods in enzymologie. COLOWICK S.P., KAPLAN N.O. Ed.
New York Acad. Press. Inc. 1957, 3, 871.
- 197 – **STREHLER B.L., TOTTER J.R.**
Firefly luminescence in the study of energy transfe mechanisms.
I – Substrate and enzyme determination.
Arch. Biochem. Biophys. 1952. 40, 28.
- 198 – **STREHLER B.L., TOTTER J.K.**
Determination of ATP and related compounds : firefly luminescence and other methods.
Methods of biochemical analysis GLICK D. Ed.
Interscience publishers. New York, 1954, 1, 341.
- 199 – **SZASZ G., GERHARDT W., GRUBER W.**
Creatine kinase in serum : 3 : Further study of adenylate kinase inhibitors.
Clin. Chem. 1977, 23, 1888

- 200 – SZASZ G., GERHARDT W., GRUBER W., BERNT E.
Creatine kinase in serum. 2 : Interferences of adenylate kinase with the assay.
Clin. Chem. 1976, 22, 1806.
- 201 – SZASZ G., GRUBER W., BERNT E.
Creatine kinase in serum - 1. Determination of optimum reaction conditions.
Clin. Chem. 1976, 22, 650.
- 202 – TAKAHASHI K., USHIKUBO S., OIMOMI M., SHINKO T.
Creatine phosphokinase isoenzymes of human heart muscle and skeletal muscle.
Clin. Chim. Acta. 1972, 38, 285.
- 203 – TAKESHITA K., YOSHINO K., KITAHARA T., NAKASHIMA T., KATO M.
Survey of Duchenne type and congenital type of muscular dystrophy in Shimane - Japan.
Jap. J. Human Genet., 1977, 22, 43.
- 204 – TANZER M.L., GILVARG C.
Creatine and creatine kinase measurement.
J. Biol. Chem. 1959, 234, 3201.
- 205 – THOMSON W.H.S.
An investigation of physical factors influencing the behaviour in vitro of serum creatine phosphokinase and other enzymes.
Clin. Chim. Acta. 1969, 23, 105.
- 206 – TURPIN J.C.
Le dépistage enzymologique de la myopathie.
Ann. Pediat. 1975, 22, 99.
- 207 – VASSELA F., RICHTERICH R., ROSSI E.
The diagnostic value of serum creatine kinase in neuromuscular and muscular disease.
Pediatrics 1965, 35, 312.
- 208 – VIGNON E., ROBERT J.M.
Les dystrophies musculaires non myotoniques. Aspects cliniques et génétiques.
Cahiers médicaux lyonnais, 1971, 47, 1603
- 209 – VIGNOS P.J., SPENCER G.E., ARCHIBALD K.C.
Management of progressive muscular dystrophy of childhood
J. Amer. Med. Ass., 1963, 184, 98.
- 210 – WALTON J.M.
On the inheritance of muscular dystrophy.
Ann. Human. Genet. 1955, 20, 1.

- 211 – WALTON J.N., CARDNER-MEDWIN D.
Muscular dystrophy and myotonic disorders.
"Disorders of voluntary muscle".
Churchill Livingstone. 1974, 561.
- 212 – WHARTON B.A.
Duchenne muscular dystrophy : early diagnosis and screening
Arch. Dis. Child. 1976, 51, 985 (correspondence)
- 213 – WEBB J.H.
Prenatal Diagnosis of Duchenne muscular dystrophy.
Lancet, 1977, 22, 140.
- 214 – WHITE E.H., MAC CAPRA F., FIELD G.F., MAC ELROY W.D.
The structure and synthesis of firefly luciferin.
J. Am. Chem. Sc., 1961, 83, 2402.
- 215 – WITTEVEEN S.A.G.J., SOBEL B.E., DE LUCA M.
Kinetic properties of the isoenzymes of human creatine phosphokinase
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1974, 71, 1384.
- 216 – WONG P.C.P., SMITH A.F.
Biochemical differences between the MB and MM isoenzymes of creatine kinase.
Clin. Chim. Acta. 1976, 68, 147.
- 217 – WYATT P.R., COX D.M.
Duchenne's muscular dystrophy. Studies in cultured fibroblasts.
Lancet, 1977, 22, 172.
- 218 – ZELLWEGER H., ANTONIK A.
Newborn screening for Duchenne muscular dystrophy.
Pediatrics, 1975, 15, 30.
- 219 – ZELLWEGER H., IONASESCU V., SIMPSON J., WAZIRI M., ANTONIK A.
Screening of the newborn for Duchenne muscular dys trophy.
Brit. Med. J. 1975, 767, 5986.
- 220 – ZITER F.A., ALLSOP K.G.
The diagnosis and management of childhood muscular dystrophy.
Clin. Pediat., 1976, 15, 540.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

JUSTIFICATION DU DEPISTAGE DE LA MYOPATHIE DE
DUCHENNE DE BOULOGNE (DMD) 2

1 - Caractères de la maladie 2

 1.1. Clinique 2

 1.2. Biochimie 3

 1.3. Anatomo-Pathologie 3

 1.4. Electromyographie 4

 1.5. Génétique 4

2 - Justification du Dépistage néonatal de la DMD 7

3 - Organisation de l'Association Régionale pour le Dépistage et l'Etude
des Maladies Métaboliques de l'Enfant (ARDEMME) 12

CHAPITRE I

CARACTERISTIQUES DU TEST 15

I.1. Conditions du prélèvement 15

I.2. Technique de prélèvement 17

 I.2.1. Matériel 17

 I.2.2. Technique 17

 I.2.3. Envoi du laboratoire 17

I.3. Conservation de l'activité enzymatique 17

I.4. Principe de la réaction 18

I.5. Matériel 19

I.6. Réactifs 19

I.7. Réalisation du test 20

CHAPITRE II.

LA REACTION DE BIOLUMINESCENCE :

LUCIFERINE - LUCIFERASE - ATP (LL/ATP)	22
II.1. Rappel de généralités sur la créatine-kinase	22
II.1.1. Réaction catalysée	22
II.1.2. Propriétés physico-chimiques de l'enzyme purifiée	22
II.1.3. Isoenzymes	24
II.1.4. Détermination de l'activité enzymatique	25
II.2. La réaction de bioluminescence : historique - définition	27
II.3. Extraction de la luciférase	31
II.3.1. Méthode de MAC ELROY et COULOMBRE	31
II.3.2. Méthode d'ANTONIK	31
II.3.3. Méthode de RHEE et GREIFNER	32
II.3.4. Propriétés physico-chimiques et contrôle de qualité de l'extrait brut	32
II.4. Préparation de la luciférase purifiée	34
II.4.1. Méthode de GREEN et MAC ELROY	34
II.4.2. Méthode de NIELSEN et RASMUSSEN	34
II.4.3. Propriétés physico-chimiques et contrôle d'activité de l'extrait purifié	34
II.4.4. Production de la D (-) Luciférine	35
II.5. Mécanisme de la réaction de bioluminescence	39
II.5.1. Description de la réaction	39
II.5.2. Cinétique de la réaction de bioluminescence	39
II.5.3. Réaction produite avec la déhydroluciférine	44
II.5.4. Caractères de la bioluminescence	46
II.5.5. Structure de la luciférase	50
II.5.6. Conclusions	51
II.6. Rôle de la pyrophosphatase dans l'extrait brut de Luciférine-Luciférase	53
II.6.1. Rappels bibliographiques	53
II.6.2. Travaux personnels	55
II.6.3. Conclusions	61

II.7.	Influence de la production endogène d'ATP.	62
II.7.1.	Rappels bibliographiques	62
II.7.2.	Travaux personnels	63
II.7.3.	Conclusions	69
II.8.	Performances de la réaction ATP /LL	71
II.8.1.	Linéarité	71
II.8.2.	Détectabilité de l'ATP — Données bibliographiques	74
II.8.3.	Précision — Travaux personnels	74
II.8.4.	Exactitude — Données bibliographiques	75
II.8.5.	Conclusions	76
 CHAPITRE III.		
ETUDE DE LA REACTION DE COUPLAGE : CK - ATP - LL		77
III.1.	Conditions opératoires	79
III.1.1.	Choix du pH	79
III.1.2.	Choix du tampon	79
III.1.3.	Choix du sel de magnésium — Données bibliographiques	79
III.1.4.	Choix de la concentration en ADP	79
III.1.5.	Choix de la concentration en créatine-phosphate - travaux personnels	81
III.1.6.	Conclusions	83
III.2.	Etude de la cinétique globale	84
III.2.1.	Données expérimentales	84
III.2.2.	Approche mathématique	85
III.2.3.	Interprétations	87
III.2.4.	Conclusions	89
III.3.	Fiabilité de la réaction	90
III.3.1.	Spécificité : travaux personnels	90
III.3.2.	Linéarité	91
III.3.3.	Mise en évidence du phénomène de "QUENCHING" Travaux personnels	92

III.3.4.	Correspondance entre UL et UI (Méthode d'OLIVER ROSALKI)	93
III.3.5.	Précision - travaux personnels	94
III.3.6.	Recherche de contaminants éventuels inhibiteurs des réactions - Travaux personnels	96
III.3.7.	Conservation des échantillons — Travaux personnels	97
III.3.8.	Conclusions	99

CHAPITRE IV.

RESULTATS	100
IV.1. Résultats du dépistage néonatal systématique de la DMD	100
IV.2. Suites données aux tests positifs	102
IV.3. Etude des cas confirmés.	104
DISCUSSION	107
CONCLUSIONS	113
RESUME	115
BIBLIOGRAPHIE	121

